

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER EINE
WÄRMEINAKTIVIERUNG VON
PASTEURELLEN UNTER ERHALT DER
IMMUNISIERENDEN EIGENSCHAFTEN**

Stefan Chorherr

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556029_0007

AUS DEM INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE
UND INFEKTIONSKRANKHEITEN DER TIERE
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Vorstand: Professor Dr. Dr. h. c. Anton Mayr

UNTERSUCHUNGEN ÜBER EINE WÄRMEINAKTIVIERUNG
VON PASTEURELLEN
UNTER ERHALT DER IMMUNISIERENDEN EIGENSCHAFTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Stefan Chorherr
aus Weilheim

München 1974

GEDRUCKT MIT GENEHMIGUNG DER
TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H. E. Krampitz

Tag der Promotion: 22. Februar 1974



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM: PASTEURELLA MULTOCIDA-IMPfstOFFE BEIM RIND	2
2. 1. <u>Herstellung von Pasteurella multocida-Impfstoffen</u>	3
2. 1. 1. Pasteurella multocida-Impfstämme	3
2. 1. 2. Züchtung von Pasteurella multocida	6
2. 1. 3. Pasteurella multocida-Impfstoffe auf der Basis inaktivierter Erreger	6
2. 1. 3. 1. Inaktivierung mit chemischen Mitteln	6
2. 1. 3. 2. Inaktivierung mit physikalischen Mitteln	7
2. 1. 4. Pasteurella multocida-Spaltimpfstoffe	8
2. 1. 5. Pasteurella multocida-Lebendimpfstoffe	9
2. 1. 6. Kombinationsimpfstoffe	9
2. 1. 7. Adjuvantien bei Pasteurella multocida-Impfstoffen	10
2. 2. <u>Wirksamkeitsprüfung bei Pasteurella multocida- Impfstoffen</u>	11
2. 3. <u>Impfschäden bei Pasteurella multocida-Impfstoffen</u>	14
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
3. 1. <u>Material und Methoden</u>	21
3. 1. 1. <u>Versuchstiere</u>	21
3. 1. 2. <u>Herstellung der Pasteurella multocida-Impfstoffe</u>	21

	Seite
3.1.2.1. Pasteurella multocida-Impfstamm	21
3.1.2.2. Züchtung von Pasteurella multocida	22
3.1.2.3. Inaktivierung der Pasteurellen mit Formalin	24
3.1.2.4. Inaktivierung der Pasteurellen mit Wärme	24
3.1.2.5. Dichteeinstellung der Impfstoffe	24
3.1.2.6. Adjuvantien	25
3.1.2.7. Sterilitätskontrolle	25
3.1.3. <u>Prüfung auf Unschädlichkeit der Pasteurella multocida-Impfstoffe</u>	26
3.1.4. <u>Prüfung auf Immunogenität der Pasteurella multocida-Impfstoffe</u>	26
3.1.4.1. Aktiver Mäuseschutzversuch nach <u>Ose</u> und <u>Muenster</u>	26
3.1.4.2. Indirekte Hämagglutination nach <u>Baxi</u>	27
3.2. <u>Ergebnisse</u>	30
3.2.1. <u>Wärmeinaktivierung von Pasteurella multocida</u>	30
3.2.1.1. Inaktivierungskinetik bei 98° C	30
3.2.1.2. Inaktivierungskinetik bei 60° C	33
3.2.2. <u>Ergebnis der Prüfung auf Unschädlichkeit</u>	35
3.2.3. <u>Ergebnis der Prüfung auf Immunogenität</u>	35
3.2.3.1. Aktiver Mäuseschutzversuch	35
3.2.3.2. Antikörpertiter nach Impfung mit den verschiedenen Pasteurella multocida-Impfstoffen	45
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	49

5. ZUSAMMENFASSUNG

53

6. LITERATURVERZEICHNIS

55

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

Die enzootisch alljährlich auftretende Rindergrippe belastet unsere Rinderzucht in immer stärkerem Maße. Über die Ätiologie der Krankheit weiß man heute zwar mehr als früher, aber leider noch nicht alles. Sie stellt nach den neuesten Untersuchungen eine infektiöse Faktorenkrankheit dar, an deren Zustandekommen mikrobielle Erreger und nicht mikrobielle Faktoren, wie z. B. Kälte, zusätzlich beteiligt sind. Neben bestimmten Virusarten diskutiert man auch Pasteurellen, letztere vor allem als Sekundärerreger, die das Krankheitsbild verschlimmern können. Aus diesem Grunde versuchte man immer wieder in sogenannte Grippeimpfstoffe auch eine Pasteurella-Komponente einzubauen. Die Pasteurellen wurden dabei mit Formalin inaktiviert. In Kombinationsimpfstoffen, die gleichzeitig vermehrungsfähige attenuierte Impfviren enthalten, können Formalinreste aus der Pasteurellen-Inaktivierung störend wirken. Man hat deshalb nach anderen Inaktivierungsverfahren gesucht. Eine Lösung wäre die Inaktivierung mit Wärme.

In der vorliegenden Arbeit soll an einem als Modell dienenden Pasteurella multocida-Stamm untersucht werden, ob Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit von Pasteurella multocida-Impfstoffen aus formalininaktivierten und aus wärmeinaktivierten Erregern bestehen.

2. SCHRIFTTUM: PASTEURELLA MULTOCIDA-IMPfstOFFE BEIM RIND

Pasteurella multocida-Impfstoffe wurden beim Rind ursprünglich zur Prophylaxe der Hämorrhagischen Septikämie, die als spezifische Pasteurellose hervorgerufen durch die *Pasteurella multocida*-Typen: 6:B und 6:E gilt (72), entwickelt (Tabelle 1). Nachdem *Pasteurella multocida* auch bei Faktorenseuchen, besonders im Rahmen des BRD-Komplexes (bovine respiratory disease-K.) neben *Pasteurella haemolytica* (62, 96, 110) und verschiedenen Viren (98, 38) als Erreger eine wichtige Rolle zu spielen scheint (38, 85, 90, 97, 99), setzt man bei diesen Erkrankungen ebenfalls Past. mult.-Vakzinen ein (Tabelle 2). Mit Schutzimpfungen gegen die Hämorrhagische Septikämie konnten gute Erfolge erzielt werden (1, 29, 107, 109). Bei den Faktorenseuchen ist jedoch der Wert von Past. mult.-Impfstoffen umstritten (34, 89). Da *Pasteurella multocida* im Rahmen dieser Erkrankungen zwar einen wichtigen, aber nur einen Faktor darstellt, ist man hier von der Applikation einfacher Past. mult.-Impfstoffe (18, 77) zur Anwendung von Kombinationsvakzinen aus Past. haem., Past. mult. und verschiedenen Viren übergegangen. Die Pasteurellen-Komponente in einem derartigen Mehrfachimpfstoff hat die Aufgabe, vor schweren Verlaufsformen beim BRD-Komplex, die häufig durch Pasteurellen verursacht werden (90, 97), zu schützen. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn der Impfschutz durch Viren bereits durchbrochen ist (34). Die Herstellung eines befriedigend wirksamen Past. mult.-Impfstoffes, der alle als Erreger in Frage kommenden Typen erfasst, ist aber außerordentlich schwierig (100), zumal bislang keine ausreichenden epidemiologischen Untersuchungen über die Art der Past. mult.-Typen, die bei Faktorenseuchen auftreten, und über deren Kausalbeziehungen zu diesen Erkrankungen vorliegen.

Einen Überblick über die Problematik von *Pasteurella multocida*-Impfstoffen gibt die folgende Zusammenstellung.

2.1. Herstellung von Pasteurella multocida-Impfstoffen

2.1.1. Pasteurella multocida-Impfstämme

Für die Herstellung wirksamer Past.mult.-Impfstoffe ist die Verwendung stark immunogener Past.mult.-Stämme unter Berücksichtigung der als Erreger in Frage kommenden Typen von entscheidender Bedeutung. Da unter Pasteurella multocida, insbesondere bei Stämmen, die aus Pneumonielungen isoliert wurden, schwache Immunitätsbildner weit verbreitet sind (96), müssen die immunisierenden Eigenschaften eines jeden Stammes, bevor er zur Impfstoffproduktion herangezogen wird, überprüft werden. Morphologische Kriterien (Wuchsform, Kapselbildung) sind für eine derartige Prüfung nicht ausreichend, geben aber nach Carter (18) gewisse Anhaltspunkte. Zur Impfstoffherstellung hält Carter nur frisch isolierte Stämme mit Kapselbildung für geeignet. Heddleston et al. (46) konnten allerdings zeigen, daß unkapselte Erreger ebenfalls eine belastungsfähige Immunität auszubilden vermögen. Mit Sicherheit kann die Immunogenität eines Stammes bislang nur im Tierversuch unter Beachtung der Wirtsspezifität des Erregers festgestellt werden.

Bei der Auswahl von Impfstämmen ist aber nicht nur der Ausschluß schwacher Immunitätsbildner, sondern auch die Berücksichtigung der verschiedenen Past.mult.-Serotypen unbedingt erforderlich, da zwischen diesen Typen auf Grund ihrer heterogenen Antigenstruktur keine, oder nur eine unvollständige Kreuzimmunität besteht. Nachdem zur Identifizierung dieser Typen biochemische Methoden versagt haben, wurden verschiedene serologische Typisierungsverfahren entwickelt. Little et al. (57) verwendeten dazu die Objekträgeragglutination und fanden drei verschiedene Typen 1 - 3. Roberts (84) teilte Pasteurella multocida mit Hilfe des Mäuseschutzversuches in die Typen I - IV ein. Das gebräuchlichste Typisierungsverfahren entwickelte Carter auf der Basis des indirekten Hämagglutinationstestes (IHA-T.) (15, 19, 21, 22, 25). Mit diesem Verfahren gelang es Carter an Hand der unterschiedlichen Kohlenstoffzusammensetzung der Kapsellipopolysaccharide von Pasteurel-

la multocida (24) die Typen A, B, D und E zu differenzieren. Carter (23) verglich daraufhin in einem Immunisierungsversuch den IHA-Titer mit der schützenden Kapazität von Seren im passiven Mäuseschutztest und stellte dabei eine lineare Relation fest. Auch Penn et al. (78) konnten reines typspezifisches Kapselantigen aus Saline-Extrakten der Past. mult. -Typen B und E von endotoxinhaltigen Bestandteilen der Kapsel abtrennen und damit beim Rind Immunseren gewinnen, die im passiven Mäuseschutztest eine typspezifische Immunität hervorriefen. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß bei der Ausbildung einer Immunität Kapselantigene eine wichtige Rolle spielen. Zwischen Stämmen des gleichen Kapseltyps besteht aber nach Namioka et al. (71, 72) nicht in jedem Fall eine vollkommene Kreuzimmunität. Aus diesem Grunde reicht der IHA-Test von Carter nicht aus, um die verschiedenen Past. mult. -Typen eindeutig zu definieren. Namioka et al. (68) entwickelten deshalb einen speziellen Agglutinationstest zur Bestimmung weiterer Antigene von Pasteurella multocida, die ihrer Ansicht nach vom Bakterienleib stammen und aus Lipopolysaccharid-Protein-Komplexen bestehen (72). Durch Analyse der somatischen- oder O-Antigene mit diesem Test fanden Namioka et al. bei Pasteurella multocida 12 verschiedene O-Gruppen. Da die O-Gruppenantigene unabhängig von den Kapselantigenen Carter's auftreten, ermöglichen sie eine weitere Unterteilung der Kapseltypen. Der Serotyp von Past. mult. kann demnach durch Kapseltyp und O-Gruppe definiert werden (Schreibweise z. B.: 1:A).

Eine weitere Verbesserung des Typendifferenzierungsverfahrens versuchten Baxi et al. (12) durch Immundiffusion und Immunelektrophorese, sowie mit Modifikationen des IHA-Testes zu erreichen. Sie konnten aber mit diesen Methoden nur bedingt typspezifische Antigene feststellen. Auch Prince et al. (80) benutzten zum Studium der Antigenstruktur von Past. mult. die Immundiffusionstechnik und definierten damit 18 lösliche Antigene, von denen zwei oberflächlich und sechzehn tiefer gelegen sein sollen. Prince et al. vertreten (80) wie Namioka et al. (71, 72) die Ansicht, daß für die Ausbildung einer Immunität neben den Kapselantigenen auch die somatischen Antigene wichtig sind. Dies hat für die Auswahl von Past. mult. -Stämmen zur Vakzineproduk-

tion praktische Bedeutung. So muß nach Henning (51) bei Impfstämmen nicht nur der Kapseltyp, sondern auch der somatische Typ berücksichtigt werden, da den O-Antigenen eine wichtige Rolle bei der Immunisierung zukommt. Cimoch (32) glaubt sogar, daß eine Vakzine nur dann wirksam ist, wenn Impfstamm und Feldstamm hinsichtlich ihrer O-Antigene einen gleichen Aufbau besitzen.

Die verschiedenen Typisierungsverfahren für *Pasteurella multocida* haben natürlich nur dann einen praktischen Wert, wenn sie die Möglichkeit schaffen, geeignete Stämme für die Vakzineherstellung zu finden. Da aus den angeführten Arbeiten (23, 71, 72, 78) hervorgeht, daß K-Antigene und O-Antigene für die Immunisierung große Bedeutung haben, scheint die Kombination von Kapseltypbestimmung nach Carter und O-Gruppenantigenanalyse nach Namioka das bisher brauchbarste Instrument zur Auswahl von Vakzinestämmen darzustellen.

Um bei der Herstellung von Past. mult. -Impfstoffen die entsprechenden Serotypen berücksichtigen zu können, muß natürlich auch die Verteilung der Typen auf die einzelnen Tierarten und ihre Beziehung zu den verschiedenen Krankheiten bekannt sein. Trotz zahlreicher Untersuchungen sind diese Fragen noch nicht vollständig gelöst. Über die Verbreitung der Past. mult. -Typen unter den verschiedenen Tierarten wurde vor allem von Namioka et al. (67, 69, 70, 71, 72), von Carter (17, 19, 22) und von Cimoch (32) gearbeitet. Nach einer Veröffentlichung von Henning (51) treten in Deutschland beim Rind die Kapseltypen B, D und E auf (Tabelle 3). Bei all diesen Untersuchungen zeigt sich der große Nachteil der bisherigen Typisierungsverfahren; durch sie können nämlich nicht alle Past. mult. -Stämme erfaßt werden (15, 72). Da folglich zahlreiche Stämme keine Berücksichtigung finden, ist bei Past. mult. -Impfstoffen ein vollständiges Antigenmuster kaum zu erreichen. Nach Norwood (100) liegt darin aber häufig der Grund für die mangelhafte Wirksamkeit von Past. mult. -Impfstoffen. Eine allen Ansprüchen gerecht werdende Typisierung von *Pasteurella multocida* gibt es leider noch nicht.

2.1.2. Züchtung von Pasteurella multocida

Pasteurella multocida läßt sich zwar leicht auf künstlichen Nährböden anzüchten, doch treten nach verhältnismäßig kurzer Zeit in den Kulturen verschiedene Dissoziationsformen auf, die sich in ihrem Antigenmuster von den ursprünglichen Keimen unterscheiden (8, 71). So konnten Heddleston et al. (50) in Immunisierungsversuchen nachweisen, daß Pasteurella multocida auf künstlichen Nährböden ein wesentlich geringeres Immunogen-Spektrum produziert als in lebenden Tieren. Um die Antigenität von Pasteurella multocida auch unter Laborbedingungen möglichst vollständig erhalten zu können, wird die Lyophilisation der Keime (3, 18), oder die Aufbewahrung in Blut (3, 8) oder in befallenen Organen (95) bei sehr tiefen Temperaturen empfohlen. Für die Impfstoffherstellung ist die Züchtung von Pasteurella multocida auf festen und in flüssigen Nährböden geeignet (3, 8). Zur Großproduktion von Vakzinen haben sich Fermenter bewährt (3, 8, 11, 39, 6, 7). Die Nährmedien (6, 8, 11, 14, 39) müssen auf die relativ anspruchsvollen Keime abgestimmt sein, da sich sonst das Antigenspektrum der Erreger leicht verändert (7, 8). Wegen der Gefahr der Allergisierung sollten die Medien nur aus synthetischen Komponenten bestehen. Zur Erhaltung des Immunogenspektrums von Pasteurella multocida ist es wichtig, die Bebrütungstemperatur möglichst konstant auf 37° C zu halten und eine Bebrütungszeit von 18 - 20 Stunden nicht zu überschreiten (6, 7). Carter (18) empfiehlt sogar eine Bebrütungszeit von nur 6 - 8 Stunden.

2.1.3. Pasteurella multocida-Impfstoffe auf der Basis inaktivierter Erreger

2.1.3.1. Inaktivierung mit chemischen Mitteln

Pasteurella multocida-Impfstoffe werden in der Regel auf der Basis von Erregern hergestellt, die mit chemischen Mitteln inaktiviert worden sind. Am häufigsten dient dazu Formalin und zwar in möglichst niedriger Konzentra-

tration (18). Neben Formalin wurde eine große Zahl anderer chemischer Substanzen auf ihre Eignung als Inaktivierungsmittel geprüft. Cameron et al. (14) erprobten Formalin, Phenol und Merthiolate. Bei einem Immunisierungsversuch am Kaninchen stellten Cameron et al. die stärkste Antikörperstimulierung durch Merthiolate-Impfstoffe fest. Derartige Impfstoffe besaßen aber auch die größte Toxizität. Heddleston et al. (50) verglichen im aktiven Mäuseschutzversuch den Einfluß von Formalin, Propionlaktol, Thiomersal und Neomycin auf die Immunogenität von Past. mult. -Impfstoffen. Es ließ sich aber kein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit der verschiedenen Vakzinen nachweisen.

2.1.3.2. Inaktivierung mit physikalischen Mitteln

Die gebräuchlichste physikalische Methode zur Inaktivierung von Pasteurellen bei der Vakzineproduktion ist die Einwirkung von Wärme. Diese Art der Inaktivierung wurde bei Pasteurellen mit sehr unterschiedlichen Verfahren hinsichtlich Temperaturstufe und Einwirkungszeit angewendet. Die Beurteilung der einzelnen Verfahren ist schwierig, da selten direkte Vergleiche zu anderen Inaktivierungsmethoden hergestellt wurden. Sinha et al. (93) benutzten zur Inaktivierung eine Temperatur von 60° C und eine Zeit von 10 Minuten und erzielten mit diesem Impfstoff nach einmaliger intraperitonealer Verabreichung an Mäuse einen signifikanten Schutz. Bei Hühnern konnte Ryu (86) mit Pasteurellen, die mit einer Temperatur von 60° C bzw. 100° C und einer Inaktivierungszeit von 1 Stunde inaktiviert waren, im aktiven Schutzversuch eine Überlebensrate von 52 % erreichen, mit einem Natriumkarbonat-Impfstoff dagegen 71 %. Cameron et al. (14) verglichen chemische Inaktivierungsmethoden mit einer Wärmeinaktivierung bei 120° C und 15 Minuten und stellten beim Kaninchen nach Verabreichung des Impfstoffes aus wärmeinaktivierten Pasteurellen etwas niedrigere Antikörpertiter fest. Einen ähnlichen Versuch führten Heddleston et al. (50) durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß hitzegetrocknete Pasteurellen bei Mäusen eine ebenso gute Immunität ausbilden wie Pasteurellen, die mit verschiedenen chemischen Mitteln inakti-

viert waren. Shrivastava et al. (91, 92) benutzten zur Inaktivierung einen Hitze-Kälte-Schock (Inaktivierung bei 56° C für 4 1/2 Minuten und plötzliche Abkühlung auf 0° C) und einen Kälte-Hitze-Schock (plötzliche Erhöhung der Temperatur von 0° C auf 56° C). Mit diesen Methoden gelang es Shrivastava Pasteurellenimpfstoffe herzustellen, die im aktiven und passiven Mäuseschutzversuch die immunisierenden Eigenschaften einer Formolvakzine übertrafen.

2.1.4. Pasteurella multocida-Spaltimpfstoffe

Gelegentlich wird nach der Verabreichung von *Pasteurella multocida*-Impfstoffen aus Vollantigen ein Toxinschock beobachtet (8, 10). Es wurde daher versucht die toxischen Komponenten der Erreger von den atoxischen Komponenten abzutrennen, ohne die immunisierenden Eigenschaften der auf diese Weise entgifteten Pasteurellen zu zerstören. Nach einem Bericht von Batu (10) traten bei der Impfung von 80075 Rindern und Büffeln 121 anaphylaktische Reaktionen und 5 Todesfälle auf. Experimentelle Impfungen bei Kälbern mit Formolvakzinen zeigten, daß Impfstoffe, die Kulturflüssigkeit enthielten, derartige Reaktionen provozierten, nicht dagegen Impfstoffe aus Bakterien, die in phys. NaCl gewaschen waren. Srivastava et al. (95) führten Immunisierungsversuche an der Maus mit verschiedenen Bestandteilen von *Pasteurella multocida* durch. Sie verglichen zunächst Kulturfiltrat, Zytoplasma und Zellwände im aktiven Schutzversuch hinsichtlich ihrer immunisierenden Eigenschaften und stellten fest, daß die Zellwände am besten schützten. Im Intradermaltest beim Kaninchen waren die Zellwände weniger toxisch als das Kulturfiltrat und das Zytoplasma. Srivastava et al. trennten außerdem das Kulturfiltrat in der Säulenchromatographie in verschiedene Fraktionen auf und erzielten mit Fraktion 1 bei Mäusen einen sehr guten Schutz. Diese Fraktion hatte auch die geringsten toxischen Eigenschaften. Mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden gelang es Nagy et al. (66) aus Saline-Extrakten von *Pasteurella multocida* endotoxinhaltige Kapselbestandteile von typspezifischen Antigenen abzutrennen und mit diesen Antigenen Rinder zu immunisieren. Die

Seren dieser Rinder zeigten im passiven Mäuseschutzversuch eine gute Schutzwirkung. Mukkur et al. (64) impften Rinder mit einem Kaliumthiozyanat-Extrakt von *Pasteurella multocida*. Diese Rinder widerstanden einer experimentellen Belastung mit virulenten Pasteurellen. In einer weiteren Untersuchung von Mukkur et al. (65) erwies sich der Kaliumthiozyanat-Extrakt von *Past. mult.* als immunogen und atoxisch; ein Natriumchlorid-Extrakt dagegen besaß toxische Eigenschaften. Larson et al. (56) prüften ein "detoxified pasteurella bacterin" auf seine immunisierende Wirkung bei Kälbern im Agglutinationstest und stellten fest, daß diese Vakzine weniger toxisch und stärker immunogen war als ein anderer handelsüblicher Impfstoff. Auf die Art des Entgiftungsverfahrens bei der Herstellung dieser Vakzine ging Larson nicht näher ein.

2.1.5. Pasteurella multocida-Lebendimpfstoffe

In jüngster Zeit wurde die Möglichkeit mit avirulenten Pasteurellen zu immunisieren, die 1880 bereits Pasteur beschrieben hatte, wieder aufgegriffen. Bierer et al. (13) verabreichten Puten oral über das Trinkwasser einen avirulenten *Past. mult.*-Stamm als Boosterimpfung und erzielten damit eine belastungsfähige Immunität. Immunisierungsversuche von Masjukov (58) mit Pasteurellen, die durch Passagen auf Meerschweinchen und Grasfröschen in ihrer Virulenz abgeschwächt waren, verliefen beim Huhn ebenfalls positiv. Cerruti et al. (28, 29, 30, 31) setzten bei Büffeln avianisierte Pasteurellen als Impfstoff ein. In Feld- und Laborversuchen konnten Cerruti et al. nachweisen, daß dieser Lebendimpfstoff nicht nur einen guten Schutz induzierte, sondern von den Impflingen auch ausgezeichnet vertragen wurde.

2.1.6. Kombinationsimpfstoffe

Pasteurella multocida-Impfstoffe werden nicht selten in der Kombination mit anderen Bakterien (14, 54, 56) und verschiedenen Viren verwendet. Am häu-

figsten sind derartige Kombinationen bei sogenannten Grippeimpfstoffen zur Prophylaxe respiratorischer Erkrankungen bei Kälbern und Rindern im Gebrauch. (Tabelle 2). Hier werden vorwiegend Parainfluenza 3- und IBR-Virusvakzinen mit *Pasteurella multocida*- und *Pasteurella haemolytica*-Impfstoffen zu einem Mehrfachimpfstoff vereinigt (37, 41, 43, 56, 59, 61, 87, 88, 89). Der Past. mult.-Anteil liegt darin häufig als polyvalente Komponente vor, weil beim BRD-Komplex im Gegensatz zur Hämorrhagischen Septikämie ein relativ großes Past. mult.-Typspektrum auftritt. In den zahlreichen Veröffentlichungen über BRD-Vakzinen werden nur selten (56) nähere Angaben über die Wirksamkeit der Past. mult.-Komponenten gemacht. Meist sind nur Antikörperreaktionen auf die Virusanteile oder klinische Symptome nach Exposition der Impflinge beschrieben, die kaum eine präzise Aussage über die Wirkung der Pasteurellen-Komponenten ermöglichen.

2.1.7. Adjuvantien bei *Pasteurella multocida*-Impfstoffen

Bei Pasteurellen-Impfstoffen sind Mineralöle als Adjuvantien am weitesten verbreitet. In zahlreichen Untersuchungen wird ihnen eine hervorragende Wirksamkeit zugeschrieben (1, 2, 3, 5, 7, 8, 20, 37, 39, 43, 45, 53, 62, 73, 74, 75, 82, 83, 104, 106, 107, 108, 109). Es ist allerdings nach Geneidy et al. (39) technisch nicht einfach, Emulsionen herzustellen, die bei starken Temperaturschwankungen stabil bleiben. Zur Gruppe der öligen Adjuvantien zählt auch Freunds Adjuvans (82, 83, 104). Rao et al. (82, 83) verglichen in ihren Arbeiten die Wirksamkeit von Past. mult.-Impfstoffen, die mit komplettem Freunds Adjuvans, mit inkomplettem Freunds Adjuvans und mit einem einfachen Öladjuvans kombiniert waren. Die Vakzine mit komplettem Freunds Adjuvans schützte Kaninchen am besten vor einer Infektion mit virulenten Erregern und rief bei Kälbern die stärkste Antikörperbildung hervor. Relativ häufig wird bei Pasteurellen-Impfstoffen Alaun als Adjuvans verwendet (14, 44, 11, 33, 45, 53, 101, 102, 111). Cameron et al. (14) untersuchten am Kaninchen einen Öladjuvans-Impfstoff und eine Alaunpräzipitat-

Vakzine, konnte aber keinen signifikanten Antikörpertiterunterschied nachweisen. Jayaraman et al. (53) erzielten dagegen mit einer Öladjuvans-Vakzine bei Büffelkälbern höhere Antikörpertiter als mit einem Aluminium-präzipitat-Impfstoff. Tacu et al. (101, 102) beobachteten eine Verbesserung des Schutzwertes von Rinderseren im passiven Mäuseschutzversuch durch einen Alaunzusatz zu der von ihnen benutzten Pasteurellen-Vakzine. Nach Danielson et al. (33) bewirkt jedoch Alaun keine wesentliche Erhöhung der immunogenen Eigenschaften von Pasteurellen-Vakzinen. An Aluminiumhydroxid (54, 66, 86) absorbierten Kagan et al. (54) einen Past. mult.-Clostridien-Kombinationsimpfstoff und erreichten damit bei Schafen und Kälbern eine belastungsfähige Immunität. Eine gute adjuvatorische Wirkung besitzt nach Tacu et al. (103, 105) Saponin. In ihren Untersuchungen erhöhten 0,01 %ige Saponin-Pasteurellen-Vakzinen gegenüber einem unbehandelten Impfstoff den Schutzwert von Rinderseren im passiven Schutzversuch um 10 % - 20 %. Von einem Natriumalginat-Pasteurellen-Impfstoff berichten Mukkur et al. (63). Die antigenen Eigenschaften dieses Impfstoffes waren jedoch etwas schwächer als die einer Öladjuvans-Vakzine.

2.2. Wirksamkeitsprüfung bei Pasteurella multocida-Impfstoffen

Die einfachste Methode des Wirksamkeitsnachweises bei Pasteurellen-Impfstoffen ist die Antikörpertiterbestimmung. Diese kann auf verschiedene Weise durchgeführt werden. Am gebräuchlichsten sind der Agglutinations-Test (AG-T.) (8, 53, 56, 49, 83, 85, 108), der indirekte Hämagglutinationstest (IHA-T.) (8, 14, 23, 63, 64, 85) und der passive Mäuseschutzversuch (PM-T.) (5, 8, 14, 23, 48, 66, 85, 92, 101, 102, 103, 105, 108) (Tabelle 4). Zwischen dem Hämagglutinationstiter und den Ergebnissen aus dem passiven Mäuseschutzversuch besteht nach Carter (23) eine lineare Relation. Dagegen stimmt nach Tacu et al. (105) der agglutinierende Antikörpertiter von Rinderseren nicht mit dem bei Mäusen schützenden Antikörpertiter überein. Heddleston et al. (48) glauben, daß die Immunität bei Mäusen mehr mit den IHA-Antigenen, beim Geflügel und bei Kälbern jedoch mehr mit den aggluti-

nierenden Antigenen verbunden ist. Daraus darf man aber nach Heddleston nicht schließen, daß der Agglutinationstiter oder der Hämagglutinationstiter einen Indikator für die Immunität darstellt. Auf Grund einer Untersuchung, bei der geimpfte Rinder unabhängig vom induzierten Antikörpertiter (IHA-T.) eine experimentelle Belastung mit virulenten Pasteurellen überleben, vertreten Mukkur et al. (64) wie Heddleston (48) die Ansicht, daß bei Rindern Hämagglutinine nur in begrenztem Umfang am Aufbau einer Immunität beteiligt sind. Nach Mukkur et al. haben zelluläre Mechanismen für die Immunität eine entscheidende Bedeutung. Eine Veröffentlichung von Thomas (108) scheint diese Meinung zu bestätigen. Danach zeigt bei Rindern und Büffeln ein positiver Antikörpertiter (AG-T., PM-T.) zwar eine Immunität, eine negativ verlaufende Titerbestimmung jedoch keine erhöhte Empfänglichkeit der Tiere an. Dagegen stellten Jayaraman et al. (53) fest, daß Büffelkälber mit einem Antikörpertiter von unter 1 : 80 (AG-T.) besonders empfänglich für eine Infektion mit virulenten Pasteurellen sind. Diese Untersuchungen mit ihren zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen bestätigen die Ansicht von Ose et al. (76), daß Antikörpertiter, die mit den oben aufgeführten Methoden erhalten werden, einen recht fragwürdigen Maßstab für die Wirksamkeit eines Pasteurellen-Impfstoffes darstellen.

In neueren Veröffentlichungen (40, 85) wird zur Bestimmung der Wirksamkeit von Past. mult. -Vakzinen der Serum-Bacterizidie-Test empfohlen. Golebiowski (40) beobachtete bei geimpften Tieren einen großen Anstieg der bakteriziden Aktivität der Seren, aber nur eine geringe Erhöhung der opsonierenden Aktivität. Golebiowski glaubt deshalb, daß der Schutz vor der Hämorrhagischen Septikämie vorwiegend auf der bakteriziden Aktivität der Seren beruht. Bevor man aber die Aussagekraft dieses Testes über die Wirksamkeit von Vakzinen endgültig beurteilen kann, muß noch untersucht werden, inwieweit die bakterizide Aktivität auch einen Maßstab darstellt für die Immunität gegen Pasteurellosen, die nicht septikämisch, sondern mehr chronisch verlaufen (BRD-Komplex) und häufig von zunächst klinisch inapparenten Infektionen des Respirationstraktes ihren Ausgang nehmen.

Eine direkte Methode zur Prüfung der Wirksamkeit von Pastuerellen-Impfstoffen besteht in der experimentellen Belastung von Impfungen mit virulenten Erregern. Dieser aktive Schutzversuch ist mit den Erregern der Hämor-rhagischen Septikämie gut durchführbar (1, 5, 8, 14, 30, 53, 54, 64, 83); er versagt jedoch beim Respiratory-disease-Komplex des Rindes, da nach Gale et al. (36) die aus Pneumonielungen isolierten Pasteurellen für sich allein beim Rind keine Erkrankung hervorrufen. Auf Grund der Hypothese, daß beim BRD-Komplex das Zusammenwirken von "Stressituation", Virusinfektion und bakterieller Infektion eine entscheidende Rolle spielt (42, 47), benutzten Gale et al. (37), Hamdy et al. (44) und Matsuoka et al. (59) zur Impfstoffprüfung ein Challengesystem, bei dem die Impflinge einer künstlichen Stressituation ausgesetzt und mit virulenten PI-3-Viren und Pasteurellen belastet werden. Zur routinemäßigen Wirksamkeitsprüfung einer Vakzine eignet sich aber ein derart aufwendiges Challengesystem nicht, zumal es sich nur schwer reproduzieren läßt. Aus diesen Gründen weichen Ose et al. (76) bei der Impfstoffprüfung auf kleine Versuchstiere aus. Die Übertragbarkeit der im aktiven Mäuseschutzversuch gewonnenen Ergebnisse muß aber nach Frank (35) erst nachgewiesen werden, weil die Pasteurelleninfektion beim Rind im Rahmen des BRD-Komplexes anders verläuft als bei der Maus. Dieser Nachweis ist aber wegen der bereits beschriebenen Schwierigkeiten, die bei Experimenten mit Past. mult. -Typen aus Pneumonien auftreten, nur schwer zu erbringen. Die Ergebnisse aus dem aktiven Mäuseschutzversuch reichen aber nach Ose et al. (76) zumindest für eine negative Auslese von Past. mult. -Impfstoffen aus.

Da man beim BRD-Komplex zur Zeit über kein reproduzierbares Challengesystem verfügt und die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus der Vakzineerprobung am kleinen Versuchstier fraglich ist, muß nach Frank (35) zur endgültigen Prüfung der Wirksamkeit einer Pasteurellen-Vakzine der Feldversuch herangezogen werden. Feldversuche haben aber nur nach biometrischer Versuchsplanung und sorgfältiger Auswertung, die sowohl klinische Untersuchungen als auch Laboranalysen, wie Erregerisolierung und Antikörperbestimmung, umfassen sollte, eine gültige Aussagekraft (Tabelle 4).

2.3. Impfschäden bei Pasteurella multocida-Impfstoffen

Pasteurella multocida enthält wie die meisten gramnegativen Bakterien Endotoxine oder zumindest endotoxinähnliche Substanzen (Lipopolysaccharide) (8, 85). Aus diesem Grunde ist nach Carter (18) die Impfung mit Past. mult. - Vakzinen immer mit dem Risiko eines Endotoxinschocks verbunden. Batu (10) beobachtete nach der Impfung von 80075 Rindern und Büffeln 121 anaphylaktische Reaktionen und 5 Todesfälle. Derartige Impfkomplicationen sind nach Penn et al. (78) auf den gefährlich hohen Endotoxingehalt vieler Pasteurellen-Impfstoffe, die auf der Grundlage inaktivierter, ganzer Pasteurellenkulturen hergestellt werden, zurückzuführen. Nach Engelbrecht (34) ist eine erhöhte allgemeine Anfälligkeit nach der Grundimmunisierung und nach der Revakzination mit Pasteurellen-Impfstoffen bei Kälbern ein häufig zu beobachtendes Phänomen. Larson et al. (56) untersuchte die Toxizität verschiedener Pasteurellen-Impfstoffe an Kälbern, die sich in einer Stressituation (Absetzen, Transport) befanden. Er konnte nach der Impfung zwar Anzeichen eines leichten Toxinschocks bei den Kälbern feststellen, doch waren die Erscheinungen unbedeutend und beeinflussten den Gesundheitszustand der Kälber im weiteren Verlauf nicht negativ.

Tabelle 1

Pasteurella multocida-Impfstoffe zur Prophylaxe der Hämorrhagischen Septikämie

Nr.	Jahr der Veröffentlichung	Autor	Literaturverzeichn. Nr.	Versuchsobjekt	Impfstamm	Technische Daten der Impfstoffherstellung (Inaktivierung, Adjuvans)	Anwendung, Dosis	Messung der Immunität	Impferfolg, Verträglichkeit
1	1954	Bain	1	Rinder Buffel	P. multocida Typ: I, Phase: I	Formalin, Öl (0, 25 %)	parent.	aktiver Schutzvers.	guter Erfolg
2	1956	Bain	5	Rinder Buffel	P. mult. Typ: I	Formalin, Mineralöl	2 ml/3 ml i. m.	1. aktiver Schutzversuch 2. passiver Mäuseschutz- versuch	Erfolg mit 3 ml größer gut verträglich
3	1959	Bain	7	Rinder Buffel	P. mult. Typ: I	Formalin, Öl	3 ml i. m.	Feldvers.	guter Erfolg
4	1965	Tacu et al.	101	Rinder	P. mult. II. Formalin	I. Formalin, Alaun II. Formalin	1. Impf.: 5 ml 2. Impf.: 10 ml	passiver Schutz- vers. (Maus)	Alaun erhöht die immuno- genen Eigensch. d. Vakzine
5	1966	Cernut et al.	28	Buffel	P. mult. Typ: B	aviansierte Lebendvakzine	10 ml s. c.		befriedigende Resultate
6	1966	Cernut et al.	29	Buffel	P. mult.	aviansierte Lebendvakzine	s. c.	Feldvers.	guter Erfolg, Immunität: 1 Jahr
7	1966	Kagan et al.	54	Kalber	P. mult. (kombiniert mit Clostridien)	Aluminiumhydroxid-Vakz.	2mal 2-10 ml i. m.	aktiver Schutz- vers.	Schutz bis zu 4 Monate
8	1966	Nangia et al.	73	Berg- rinder, Buffel	P. mult.	Öladjuvans-Vakzine	parent.		gute Immunität über 1 Jahr
9	1966	Nikiforova et al.	74	Rinder	P. mult.	Formalin, Öl	3-5 ml parent.		stabile, anhaltende Immunität
10	1967	Jayaraman et al.	53	Buffel- kalber	P. mult. Typ: I	I. Aluminiumphosphat-V. II. Öladjuvans-Vakzine		1. Antikörper- titert (AG-T.) 2. aktiver Schutzvers.	1. Vakzine I AK-Titer bis 1:640 Vakzine II AK-Titer bis 1:5120 2. Kalber mit Titer unter 1:80 besonders empfänglich

* AG-T.: Agglutinationstest

Lfd. Nr.	Jahr der Veröffentlichung	Autor	Literaturverzeichnis, Nr.	Versuchsobjekt	Impfstamm	Technische Daten der Impfstoffherstellung (Inaktivierung, Adjuvans)	Anwendung, Dosis	Messung der Immunität	Impferfolg, Verträglichkeit
11	1967	Tacu et al.	103	Rinder	P. mult.	I. 1°/oo Saponin II. ohne Saponin	parent.	passiver Schutzversuch	Saponin erhöht Schutzwert der Seren um 10-20%
12	1968	Cerniti et al.	31	Buffel	P. mult.	avianisierte Lebendvakzine	s. c.	1. aktiver Schutzvers. 2. Antikörpertiter	1. guter Schutz 2. befriedig. AK-Titer gut verträglich
13	1968	Makkur et al.	63	Kalber	P. mult.	Formalin, 1. Mineralöl 2. Natriumalginat	3 ml i. m.	Antikörpertiter (+IHA-T.)	mit Qiadjuvans durchschnittlich höhere AK-Titer
14	1969	Mukkur et al.	64	Berg-rinder	P. mult. Typ: I Phase: I	Kaliumthio-, Q1 zyranat-Extrakt	3 ml parent	1. aktiver Schutzvers. 2. AK-Titer (+IHA-T.) 3. passiver Schutzvers.	1. vakzinerte Tiere überlebten die Belastung unabhängig vom AK-Titer 2. AK-Titer bis 1:160
15	1969	Thomas et al.	107	Kalber (Laborvers.), Rinder (Feldvers.)	P. mult.	Qiadjuvans-Vakzine	parent.	1. Laborvers. 2. Feldversuch	1. Immunität 35 Tage n. Impf. /11 Mon. anhaltend 2. guter Erfolg im Feldversuch
16	1970	Thomas et al.	108	Rinder, Buffel	P. mult. Typ: I	Qiadjuvans-Vakzine	parent.	1. AK-Titer (AG-T.) 2. passiver Schutzvers.	AK-Titer bei 30 - 40 % der Tiere 1 Wo. n. Impf. nachweisbar
17	1972	Rao et al.	83	Kalber	P. mult.	I. Friends Adjuvans komplett II. Friends Adjuvans inkomplett III. Qiadjuvans	parent.	1. aktiver Schutzvers. 2. AK-Titer (AG-T.) 3. -G-Frakt. korrel. mit AK-Titer	1. alle Tiere überleben 2. AK-Titer bei I. am höchsten 3. -G-Frakt. korrel. mit AK-Titer
18	1972	Thomas et al.	109	Rinder, Buffel	P. mult.	Qiadjuvans-Vakzine	parent.	Feldversuch	Verringerung der Verluste durch Härmorrh. Septik.

+ AG-T.: Agglutinationstest

++ IHA-T.: Indirekter Hämagglutinationstest

Pasteurella multocida-Infektstoffe beim BRD-Komplex

Lfd. Nr.	Jahr der Veröffentlichung	Autor	Literaturverzeichnis-Nr.	Versuchsobjekt	Impfstamm	Kompon. bei Kombinationsvakzinen	Technische Daten der Infektioffersetzung (Inaktivierung, Aktivanten)	Anwendung, Dosis	Messung der Immunität	Impferfolg, Vertikularität
1	1962	Woods et al.	111	Kalber	P. mult.	Pl 3-Virus (getrennte Verabreich.)	kommerzielle Vakzine (ausunpr. zitierte HS-Bakterien)	5 ml s. c. 11 Tage v. Transp.	Feldversuch: Belastung mlt: 1. Stress 2. Pl 3-Virus 3. Pasteurellen	respiratorische Erkrankung bei Impl. u. Kontroll. in gleicher Anzahl
2	1963	Gale et al.	37	Kalber (6 - 8 Mon.)	P. mult. (isoliert aus Kalber-Lunge)	Pl 3-Virus, P. haem. 50 % Virus 25 % P. m. 25 % P. h.	Formalin, Mineralöl (0,25 %)	3mal in vered. Abet. 10 ml i. m.	experimentelle Belastung mlt: 1. Stress 2. Pl 3-Virus 3. Pasteurellen	Fieberreaktion bei: 4 von 9 Impfungen 6 von 7 Kontrolltieren
3	1963	Palstay et al.	77	Kalber	I. P. mult.		I. kommerzielle Vakzine ("bacterin" gegen HS*)	2mal 5 ml s. c.	Feldversuch: (Transport von Kalbern)	respiratorische Erkrankungen bei: Kontrolltieren
4	1964	Handy et al.	43	Kalber	II. P. haem. III. P. mult. IV. P. mult. V. P. haem.	Pl 3-Virus P. haem. T. 1 (50 % P. h. 50 % P. m.)	II. (formalinisierte Vakz. aus Hühnerembry.) III. "bivalente killed-bacterin vaccine" IV. Toxoid V. (Bacterin)	5 ml s. c. 5 ml s. c. 5 ml s. c.	klinische Symp. I. 11,8 % II. 9,38 % III. 9,77 % IV. 27,84 % V. 12,36 %	
5	1964	Handy et al.	44	Kalber (6 - 10 Mon.)	P. mult. 25 % Typ A 25 % Typ B	Pl 3-Virus P. haem. T. 1 (50 % P. h. 50 % P. m.)	Formalin, Mineralöl 25 % Virus 25 % P. h. 48,6 % Öl 1,4 % Emulg.	1. Impf.: 3 Wo. vor Transport 2. Impf.: während Transport 3. Impf.: Ankunft 5 ml i. m.	Feldversuch: klinische Symp. treten auf bei: 16,6 % der Impflinge 17,8 % der Kontrolltiere d. h. kein signifik. Unterschied	klinische Symptome treten auf bei: 16,6 % der Impflinge 17,8 % der Kontrolltiere d. h. kein signifik. Unterschied
6	1965	Handy et al.	45	Kalber	I. P. mult. Typ II Typ III Typ IV II. P. mult. (getrennte Verabreich.) P. haem. Pl 3-Virus (getrennte Verabreich.) P. haem.	Pl 3-Virus (getrennte Verabreich.) P. haem. II. kommerzielle Vakzine (Formalin, Alaun)	I. kommerzielle Vakzine (Formalin, Alaun)	2mal in 3 Wo. 5ml s. c. 2mal in 3 Wo. 5ml s. c.	experimentelle Belastung mlt: 1. Stress 2. Pl 3-Virus 3. P. m. T. II 5 Wo. n. Impf.	I. geringer Schutz (große Anzahl pathol. Veränd.) II. guter Schutz
					I. P. mult. Typ II Typ III Typ IV II. P. mult. (getrennte Verabreich.) P. haem. Pl 3-Virus (getrennte Verabreich.) P. haem.	I. kommerzielle Vakzine (Formalin, Alaun)	I. kommerzielle Vakzine (Formalin, Alaun)	2mal in 3 Wo. 5ml s. c. 2mal in 3 Wo. 5ml s. c.	Feldversuch: klinische Symptome (Fieber, Anorexie, Nasenausfl. Dyspnoe) 2. Erregertisole	I. klinische Symptome treten auf bei: Kontroll. I. 15,6 % 15,7 % II. 20,0 % 15,7 %

Lfd. Nr.	Jahr der Veröffentlichung	Autor	Literaturverzeichnis Nr.	Versuchsobjekt	Impfstamm	Kompon. bei Kombinationsvakzinen	Technische Daten der Impfstoffherstellung (Inaktivierung, Adjuvantien)	Anwendung, Dosis	Messung der Immunität	Impferfolge, Vergleichbarkeit
6	1965	Hamdy et al.	45	Kalber	III. IV. P. mult. V. P. mult.	PI 3-Virus IBR-Virus PI 3-Virus P. haem. IBR-Virus (getr. Verabr.)	IV. kommerzielle Dreifachvakzine Formalin, Öl	3mal 10 ml 3mal 10 ml 3mal 10 ml	Feldversuch: 1. Klinische Symptome (Fieber, Anorexie, Nasenausfl., Dyspnoe) 2. Erregernachweis	1. klinische Symptome treten auf bei: I. Impfl. Kontrollt. III. 20,0 % 15,7 % IV. 0 % 0 %
7	1966	Matsuoka et al.	59	Kalber	P. mult. PI 3-Virus, P. haem.	Formalin	V. kommerzielle Dreifachvakzine	3mal 10 ml 1. 3 Wo. vor Absetzen 2. währ. Abs. 3. 1 Wo. n. Abs.	experimentelle Belastung mit: 1. Stress 2. PI 3-Virus 3. P. m. P. h. Auswertung: 1. klin. Sympt. 2. Erregernachweis	1. klin. Symptome bei Impflingen geringer, Lungentuberkulosen signifik. reduziert 2. P. m. und P. h. wird bei Impfl. u. Kontrollt. ohne signif. Untersch. isoliert Impfstoff gut verträgl.
8	1969	Larson et al.	56	Kalber	I. P. mult. II. P. mult.	P. haem., Cl. chauv., Cl. septic., P. haem., Cl. chauv., Cl. septic., PI 3-Virus, IBR-Virus	I. kommerzielle Vakzine II. kommerzielle Vakzine		Antidiphterier († AG-T.)	I/II. geringer AK-Titeranstieg; Leukozytose; Körpertemperaturanstieg 6 Std. n. Impfg.;
9	1970	Gossett et al.	41	Kalber	III. Pasteurellen IV. Pasteurellen P. mult.	PI 3-Virus, IBR-Virus PI 3-Virus P. haem.	III. "pasteurella detoxified bacterin" IV. "pasteurella detoxified bacterin" kommerzielle Vakzine Formalin	2mal in 14 Tg.		III/IV. hoher AK-Titeranstieg; keine Impfkompik.
10	1972	Matsuoka et al.	61	Kalber	P. mult. P. haem.	PI 3-Virus, P. haem.	kommerzielle Vakzine (siehe: Lit. Nr.: (61, 76)) Formalin	2mal in 3 Wo. 10 ml i. m.		für Pasteurellenkomponente keine Angabe über Pasteurellenkomponente keine Angabe
11	1972	Sampson et al.	87	Rinder	Pasteur.	PI 3-Virus	"pasteurella-bacteria" als Suspensionem. f. Viren		Feldversuch:	über Pasteurellenkomponente keine Angabe

Tabelle 3

Pasteurella multocida-Typen beim Rind

Herkunft der Stämme	Serotyp	Krankheitsbild	Immunisierende Eigenschaften
+ USA, Kanada, Afrika Ägypten, Burma Vietnam	6 : B	Hämorrhagische Septikämie	weitgehende Kreuzimmuni- tät bei Rindern und Mäusen
	6 : E		
	7 : A	Septikämie	bei Mäusen keine Kreuz- immunität
	11 : B	lokale Wundin- fektion	
	1 : -	Pneumonie	
++ Deutschland	B	-	-
	D	-	-
	E	-	-

+ Untersuchungen von Namioka (71, 72)

++ Untersuchung von Henning (51)

(Die Bestimmung von Typ A war aus technischen Gründen nicht möglich.)

Tabelle 4

Bisher bekannte Wirksamkeitsprüfungen von Pasteurella multocida-Impfstoffen für Rinder

Methode		Literatur	Vor- und Nachteile
Antikörper-nachweis im Serum von Impflingen	Agglutinations-test (AG-T) Objekträger-	<u>8, 53, 83, 108</u>	<u>Aufwand gering;</u> <u>wiederholte Untersuchungen am gleichen Tier möglich;</u> <u>Antikörpertiter als Maßstab für den Impfschutz bei Pasteurellenvakzinen umstritten</u> (48, 53, 64, 76, 108);
	Röhrchen-	<u>8, 53, 56, 83, 108</u>	AG-Test nicht mit allen P. m. -Stämmen durchführbar und wenig empfindlich (8, 53, 96);
	Agargel-	<u>8, 85, 108</u>	
	indirekte Hämagglutination (IHA)	<u>8, 12, 14, 23, 63, 64, 85</u>	IHA-Test typspezifisch u. nicht mit allen P. m. -Stämmen durchführbar, aber empfindlicher als AG-T. ;
	(Komplement-bindungsreaktion (KBR))	(8, 85)	KBR unempfindlich und deshalb nicht gebräuchlich;
	Serum-Bakteri-zidie-Test (SB-T.)	<u>8, 40, 85</u>	SB-T. unempfindlich und bislang wenig untersucht;
	passiver Mäuse-schutzversuch (PM-T.)	<u>8, 5, 14, 23, 66, 85, 92, 101, 102, 108</u>	PM-T. bei ⁺ HS-Vakzinen gut geeignet (8, 78);
aktiver Schutz-versuch bei kleinen Versuchs-tieren	Maus	<u>8, 14, 50, 76, 92, 93, 95</u>	<u>Aufwand gering;</u> <u>direkter, quantitativer Nachweis des Impfschutzes beim Versuchstier (76);</u> <u>Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das Rind fraglich</u> (35, 8);
	Kaninchen	<u>73, 82</u>	
aktiver Schutz-versuch beim Rind		⁺ Häm. Sep. <u>1, 5, 8, 14, 30, 53, 54, 64, 83</u> ⁺⁺ BRD-Kompl. <u>37, 44, 59, 60</u>	<u>direkter Nachweis des Impfschutzes;</u> <u>Aufwand groß;</u> <u>im allgemeinen nur mit Erregern der Hämorrhagischen Septikämie durchführbar;</u>
Feldversuch		⁺ Häm. Sep. <u>7, 29, 107, 109</u> ⁺⁺ BRD-Kompl. <u>45, 77, 89, 102</u>	<u>direkter Nachweis des Impfschutzes möglich;</u> <u>mit allen Past. mult. -typen durchführb.</u> <u>Aufwand groß;</u> <u>Auswertung schwierig;</u>

⁺ Hämorrhagische Septikämie/ ⁺⁺ bovine respiratory disease-Komplex

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden NMRI-Mäuse beiderlei Geschlechts verwendet mit einem durchschnittlichen Gewicht von 20 - 30 Gramm bei Versuchsbeginn. Die Mäuse wurden zu je 10 Tieren in Plastik-Käfigen gehalten und mit Trokkenfutter (Altromin) und Leitungswasser gefüttert. Die Kontrolltiere lebten unter den gleichen äußeren Bedingungen,

3.1.2. Herstellung der Pasteurella multocida-Impfstoffe

3.1.2.1. Pasteurella multocida-Impfstamm

Herkunft:

Zur Impfstoffherstellung wurde ein Pasteurella multocida-Stamm benutzt, der in der bakteriologischen Diagnostik des hiesigen Instituts am 25. 6. 1971 aus dem Nasenschleim eines an Pneumonie erkrankten Jungrindes isoliert worden war.

Kultur:

Der Stamm wurde auf Blutplatten als Impfstamm weitergezüchtet. Er bildete auf der Blutplatte kleine, glattrandige, zum Zusammenfließen neigende, gläserige, besonders bei schräg auffallendem Licht opaleszierende Kolonien. Nach längerer Bebrütung erhielten die Kolonien zunehmend schleimigen Charakter und ihre Opaleszenz trat stärker in Erscheinung.

Morphologie:

Im Mikroskop zeigten die Keime die für Pasteurellen typische Gestalt: kleine,

kokkoide, gramnegative Stäbchen mit schwach bipolarer Anfärbbarkeit. Die Kapseldarstellung mit der Staining-Methode nach Jasmin (94) verlief positiv.

Pathogenität:

Die Pathogenität des Stammes für Mäuse war verhältnismäßig gering. Die LD₅₀ lag nach i.p. Applikation bei 10⁷ Keimen. (Berechnung nach der Methode von Spearman-Kärber (27)).

Biochemisches Verhalten:

Der *Pasteurella multocida*-Stamm vergärte die Zucker Dextrose, Saccharose und Trehalose sowie Maltose nach längerer Bebrütung. Lactose, Rhamnose, Salicin und Dulcitol wurden nicht gespalten. Eine Verflüssigung von Gelatine trat nicht ein. Abweichend vom üblichen biochemischen Verhalten von *Pasteurella multocida* wurden Mannit und Sorbit nicht fermentiert, Schwefelwasserstoff nur schwach und Indol kaum gebildet.

Lactose	-	Dextrose	+	Salicin	-	Sorbit	-	H ₂ S (+)
Maltose	(+)	Saccharose	+	Dulcitol	-	Gelatine	-	
Rhamnose	-	Trehalose	+	Mannit	-	Indol	(+)	

Akriflavintest:

Bei der Prüfung der Kolonien mit Hilfe des Akriflavintestes nach Carter (16) trat eine fädige Zusammenballung der Keime auf, was für das Vorliegen der mukoiden Form von *Pasteurella multocida* spricht.

3.1.2.2. Züchtung von *Pasteurella multocida*

Zur Produktion der notwendigen Antigenmenge wurde ein Fermenter⁺ mit einem 5 Liter fassenden Tank benutzt. Der Tank war mit Rührwerk und Bodenbelüftung ausgestattet.

⁺ Microferm Fermentor, New Brunswick

Als Nährmedium diente ein Pasteurella-Medium, das nach den Anweisungen von Bain und Cameron (14) mit folgender Zusammensetzung hergestellt wurde:

Casamino acids "Difco"	15 g
Casitone "Difco"	5 g
Hefeextrakt "Difco"	10 g
Saccharose	2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10,75 g
KH_2PO_4	2,72 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
Aqua dest.	1000 ml
Silicon-Entschäumer	0,1 ml

Die nicht hitzeempfindlichen Anteile des Mediums wurden im Fermentertank sterilisiert. Hefeextrakt, Pepton und Zucker mußten separat in Aqua dest. gelöst, seitzfiltriert und steril dem übrigen Medium (im Fermentertank) zugesetzt werden.

Die Beimpfung des Mediums erfolgte mit einer 18 Stunden alten Pasteurella-Kultur.

Die Bebrütungszeit des beimpften Mediums im Fermenter betrug 18 bis 20 Stunden bei einer Temperatur von 37°C . In dieser Zeit wurde das Medium ständig begast (1000 cc/min Luft) und gerührt (200 RPM). Danach wurde die Kultur 1 Stunde bei 2800 U/min^+ zentrifugiert. Der Bodensatz wurde als Antigen verwendet.

Die Keimzahl des in etwa 300 ml Kulturmedium aufgeschwemmten Bodensatzes schwankte zwischen 1 und $3 \times 10^{10}/\text{ml}$.

Zur Kontrolle auf Fremdkeime wurde die Bakteriensuspension mikroskopisch und kulturell untersucht.

⁺ Zentrifuge: Mistral 6 L (MSE)

3.1.2.3. Inaktivierung der Pasteurellen mit Formalin

Zur Inaktivierung mit Formalin wurde die Pasteurellensuspension auf einen Titer von $2 - 3 \times 10^{10}$ Keimen eingestellt, mit 40 %igem Formalin zu einem Anteil von 0,3 % versetzt und 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

3.1.2.4. Inaktivierung der Pasteurellen mit Wärme

Für die Wärmeinaktivierung der Pasteurellen wurden zwei Methoden ausgewählt. In der einen Versuchsserie (Impfstoff A) erfolgte die Inaktivierung bei einer Temperatur von 98°C für eine Zeit von 2 Minuten und in der zweiten Serie (Impfstoff B) bei einer Temperatur von 60°C für 16 Minuten.

Die Wärmeinaktivierung wurde experimentell mit 10 ml einer auf $2 - 3 \times 10^{10}$ Keime/ml eingestellten Pasteurellensuspension in einem Erlenmeyerkolben (1 l Fassungsvermögen) erprobt. Die Menge der Suspension war so bemessen, daß diese den Kolbenboden nur in dünner Schicht bedeckte und deshalb eine geringe Steigzeit der Temperatur in der Flüssigkeit während der Erhitzung angenommen werden konnte. Die beschickten Kolben wurden im Wasserbad etwa 2 Minuten bei 37°C vorgewärmt und danach bei 98°C erhitzt bzw. auf Zimmertemperatur vorgewärmt und bei 60°C im Wasserbad erhitzt. Die Abkühlung erfolgte bei Zimmertemperatur.

Zur Ermittlung der Inaktivierungskinetik wurden während der Erhitzung nach gewissen Zeitabschnitten mit einer Pipette Proben aus der Bakteriensuspension entnommen. Diese Proben wurden im Plattenverfahren titriert bzw. auf Sterilität untersucht.

3.1.2.5. Dichteeinstellung der Impfstoffe

Nach der Inaktivierung wurde die Bakteriensuspension zweimal in 0,85 %iger NaCl gewaschen und ihre Dichte mit Hilfe eines Photometers⁺ eingestellt.

⁺ Photometer: Beckmann (DB) Spectrophotometer

Bei 10facher Verdünnung des Impfstoffs mit 0,85 %iger NaCl betrug die Transparenz im Photometer 10 % gegenüber 0,85 %iger NaCl. Die Messung fand bei einer Lichtwellenlänge von 625 nm statt.

3.1.2.6. Adjuvantien

Als Adjuvantien kamen zur Verwendung:

- 1) Aluminiumhydroxid in einer Konzentration von 0,3 % im Impfstoff
- 2) Saponin in einer Konzentration von 0,05 % im Impfstoff

Bandlow (9) berichtete von einer verstärkten Antikörperbildung nach Applikation von Zellen an Meerschweinchen, wenn diese Zellen mit verschiedenen Viren befallen waren. In Anlehnung an diese Untersuchung wurde geprüft, ob verschiedene Virusarten, deren Virulenz durch Zellkulturpassagen abgeschwächt wurde, eine Steigerung der Wirksamkeit des Past.-mult.-Impfstoffes hervorzurufen vermögen.

Im einzelnen wurden folgende Viren verwendet:

- 1) Teschen-Virus (Stamm: Konratice) nach der 1196. Passage in ENS-Kulturen (Schweinenierenzellen) mit einem Titer von $10^{7,0}$ KID₅₀ pro Impfdosis.
- 2) Vakzine-Virus (Pox-Virus commune) (Stamm: Ankara) nach der 549. Passage in FHE-Kulturen (Hühnerfibroblasten) mit einem Titer von $10^{6,0}$ KID₅₀ pro Impfdosis.
- 3) Vakzine-Virus (Stamm: Ankara) nach der 497. Passage in ENS-Kulturen mit einem Titer von $10^{6,0}$ KID₅₀ pro Impfdosis.

3.1.2.7. Sterilitätskontrolle

Drei Blutplatten, eine Nährbouillon und eine Leberbouillon wurden mit jeweils 0,1 ml Impfstoff beimpft und 3 Tage bei 37° C bebrütet. Die Nährbouillon wurde danach auf einer Blutplatte ausgestrichen und nochmals be-

brütet; die Leberbouillon wurde im Grampräparat untersucht.

3.1.3. Prüfung auf Unschädlichkeit der Pasteurella multocida-Impfstoffe

Von den einzelnen Impfstoffen wurden je 0,5 ml/Maus subkutan jeweils 4 weißen Mäusen appliziert. Die Impfstoffe-A und -B (ohne Adjuvantien) wurden intraperitoneal an je 4 Mäuse mit einer Dosis von 0,5 ml/Maus verabreicht.

3.1.4. Prüfung der Immunogenität der Pasteurella multocida-Impfstoffe

3.1.4.1. Aktiver Mäuseschutzversuch nach Ose und Muenster (76)

Für den Schutzversuch wurden pro Impfstoff 50 weiße Mäuse zweimal im Abstand von 14 Tagen mit 0,5 ml des jeweiligen Impfstoffes subkutan geimpft. (Um bei den Impfstoffen mit Adjuvantien die Pasteurellenantigenmenge nicht zu verändern, wurde hier das Injektionsvolumen auf 0,6 ml pro Dosis erhöht.) 15 Tage nach der letzten Impfung erfolgte dann die Belastung der Impflinge mit verschiedenen Verdünnungsstufen einer im Fermenter gezüchteten Pasteurellenkultur. Von jeder Verdünnungsstufe erhielten 10 Mäuse je eine Dosis von 0,5 ml intraperitoneal appliziert. Parallel zu den geimpften Tieren wurden 10 Kontrolltiere pro Verdünnungsstufe belastet. Die Mortalität bei den geimpften Mäusen und bei den Kontrolltieren innerhalb einer Beobachtungszeit von 10 Tagen diente als Grundlage für die Berechnung der LD_{50} (Berechnung der LD_{50} nach der Methode von Spearman-Kärber (27)).

Zur Wertbemessung der Impfstoffe wurde die LD_{50} bei den geimpften Tieren mit der LD_{50} bei den Kontrolltieren verglichen.

Der Unterschied zwischen den Logarithmen (Basis 10) der LD_{50} bei den Impflingen und bei den Kontrolltieren diente als Maßstab für die Wirksamkeit des jeweiligen Impfstoffs und wurde als Schutzwert (Logs protection) bezeichnet.

Nach Ose und Muenster besitzt ein Impfstoff eine ausreichende Wirksamkeit, wenn sein Schutzwert mindestens 2 beträgt.

3.1.4.2. Indirekte Hämagglutination (IHA) nach Baxi (12)

Immunserumherstellung:

Zwei Kaninchen wurden zweimal im Abstand von 16 Tagen mit einem Impfstoff aus hitzeinaktivierten (98°C , 2 Min.) Pasteurellen immunisiert. Der Impfstoff für die 1. Impfung bestand aus 1 ml einer Bakteriensuspension mit 10^9 Keimen emulgiert in komplettem Freundschem Adjuvans. Er wurde subkutan an drei Körperstellen verabreicht. Bei der 2. Impfung wurden 5 ml der Vakzine mit insgesamt 2×10^{11} Keimen ohne Adjuvans intraperitoneal appliziert.

10 Tage nach der 2. Impfung wurden die Kaninchen durch Herzpunktion entblutet. Das Serum wurde bei -20°C eingefroren.

Gewinnung der Mäuseseren:

Die Mäuse wurden zur Serumgewinnung betäubt und durch Herzpunktion entblutet. Um eine ausreichend große Serummenge für die IHA zu erhalten, wurden die Seren gleichbehandelter Mäuse zu einem Pool vereinigt und bei -20°C eingefroren.

Behandlung der Seren:

Die Seren wurden vor der Durchführung des Testes bei 56°C im Wasserbad 30 Minuten inaktiviert und anschließend mit Hammelerythrozyten absorbiert. Dazu wurden 0,1 ml gewaschene Hammelerythrozyten zu je 1 ml Serum pipettiert und nach etwa 1stündiger Bebrütung des Gemisches wieder abzentrifugiert.

Antigenherstellung:

Zur Antigenherstellung wurden Blutplatten dicht mit *Pasteurella multocida* beimpft und 18 Std. bei 37°C bebrütet. Der gewachsene Bakterienrasen wurde mit 0,14 M NaCl abgeschwemmt, einmal gewaschen und auf eine Keimzahl von 10^9 pro ml eingestellt. Anschließend erfolgte mit dem Ultraschall-

gerät⁺ eine Desintegration der Pasteurellen. Von der Bakteriensuspension wurden jeweils 15 ml in ein Zentrifugenglas gefüllt, mit Glasperlen versetzt und 4 x 10 Minuten bei Stufe 6 beschallt. Um eine zu starke Erwärmung der Flüssigkeit während der Beschallung zu verhindern, wurde das Zentrifugenglas mit einem Eiswassermantel umgeben. Eine Keimzählung nach der Beschallung zur Kontrolle der Intensität der Desintegration ergab einen Titer von etwa 5×10^5 /ml. Die Suspension mit den desintegrierten Bakterienzellen wurde 2 x 15 Minuten autoklaviert (1,2 atü, 120^o C) und danach scharf zentrifugiert (3000 U/min, 20 min⁺⁺). Der gewonnene Überstand diente als Antigen.

Hammelblutkörperchen:

Das Hammelblut wurde in Alseverlösung (1,2 Vol. Alseverlsg. + 1 Vol. Hammelblut) aufgefangen und im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Durchführung des Testes wurde die benötigte Menge Hammelblutkörperchen (HE) 3 x in 0,14 M NaCl gewaschen.

Zur Sensibilisierung der Erythrozyten wurde eine 2,5 %ige HE-Suspension mit gleichem Volumen Antigen gemischt und 120 Minuten bei 37^o C im Wasserbad bebrütet. Anschließend wurden die Erythrozyten 3 x in 0,14 M NaCl gewaschen und auf eine Konzentration von 0,5 % eingestellt.

Durchführung des Testes:

Von den Mäuseseren wurde in Agglutinationsröhrchen eine Verdünnungsreihe in 2er Potenzen mit 0,5 ml Serum angelegt. Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 0,5 ml sensibilisierte HE pipettiert.

Als Kontrollen wurden ein Kaninchenimmunserum (positive Serumkontrolle) und ein Mäusenormalserum (negative Serumkontrolle) parallel zu den übrigen Seren getestet. Ferner wurden alle Seren mit nichtsensibilisierten HE

⁺ Ultraschallgerät: Branson Sonifier B-12 mit Microtip

⁺⁺ Zentrifuge: Martin Christ, Typ: UJ 3

(Serumkontrolle) und die verwendete NaCl-Lösung mit sensibilisierten HE (NaCl-Kontrolle) auf unspezifische Reaktionen geprüft.

Nach 16stündiger Bebrütung der Gemische bei Zimmertemperatur erfolgte die Ablesung der Reaktion.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Wärmeinaktivierung von Pasteurella multocida

3.2.1.1. Inaktivierungskinetik bei 98° C

Als Grundlage für die Errechnung der Inaktivierungskurve bei 98° C dienten die Mittelwerte der Ergebnisse aus drei Einzelversuchen. Bei den einzelnen Versuchen traten geringgradige Schwankungen im Ergebnis auf, die aber bei der gewählten Inaktivierungsmethode nie ganz zu vermeiden sind. Wärmeinaktivierungskurven werden durch eine große Anzahl von Faktoren beeinflusst, wie zum Beispiel: pH-Wert, Zusammensetzung und Beschaffenheit des Suspensionsmediums der Bakterien, Alter der Kulturen.

Die Wärmeinaktivierungskurven von Bakterien zeigen nach Herrmann (52) einen exponentiellen Verlauf. Zeichnet man den Anteil der überlebenden Keime im halblogarithmischen Maßstab gegen die Erhitzungszeit, so erhält man Geraden. Sie entsprechen in ihrem Verlauf einer Reaktion 1. Ordnung. Als Parameter für den Kurvenverlauf gelten neben der verwendeten Keimart vor allem die Keimzahl pro Raumeinheit und die gewählte Temperaturstufe. Wie aus der Abb. 1 ersichtlich ist, weicht die Inaktivierungskurve, die für den Impfstamm ermittelt wurde, von einer Reaktion 1. Ordnung ab. Die Anfangskeimzahl der Pasteurellensuspension von $2,5 \times 10^{10}$ /ml fiel in den ersten 10 Sekunden der Erhitzung nur minimal ab auf 2×10^{10} Keime pro ml. Dies beruht auf der Steigzeit, die die Temperatur benötigt, um in der Suspension ihre volle Höhe zu erreichen. Die Steigzeit beeinflusst das Inaktivierungsdiagramm besonders stark bei hohen Temperaturen mit entsprechend kurzen Inaktivierungszeiten. Auf den flachen Anfangsteil der Kurve folgt ein steiler Abfall bis zu einer Zeit von etwa 30 Sekunden. In dieser Zeit kam es zur Inaktivierung des größten Teils der Pasteurellen.

Die Inaktivierungskurve nähert sich nun der Abszisse, wobei der Kurvenverlauf wieder etwas flacher wird. Eine genaue Zeitangabe für den Endpunkt der Inaktivierung war nicht möglich, da in den Einzelversuchen Schwankun-

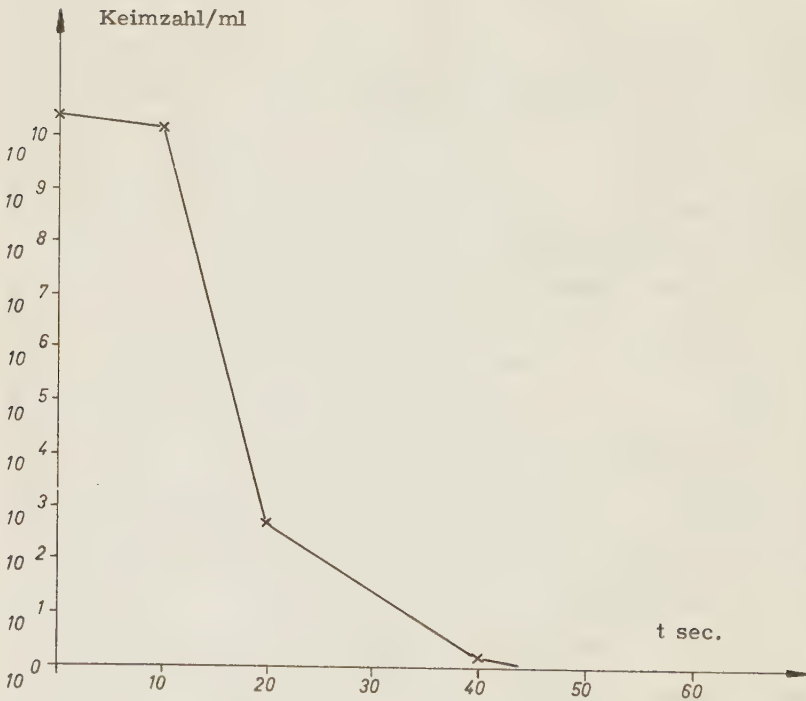
gen zwischen 40 und 60 Sekunden auftraten. Diese Unterschiede sind vor allem auf die angewandte Methodik zurückzuführen. So sind kleine Temperaturschwankungen, die sich natürlich besonders bei Kurzzeiterhitzungen auf die Inaktivierungszeit auswirken, nicht ganz zu vermeiden. Außerdem ist die Feststellung des Zeitpunktes der Inaktivierung aller Keime in der Suspension nur mit großem Aufwand möglich, da dazu die Bestimmung einer Keimzahl von unter 1 pro ml notwendig ist.

Für die Impfstoffherstellung wurde zur sicheren Inaktivierung der Pasteurellen bei 98° C eine Inaktivierungszeit von 2 Minuten, bei einer Keimzahl von $2 - 3 \times 10^{10}$ /ml, verwendet.

Abb. 1

Inaktivierungskurve für *Pasteurella multocida* bei einer Temperatur von 98° C

Inaktivierungszeit (sec.)	0	10	20	40	50 60
Keimzahl/ml	$2,5 \times 10^{10}$	2×10^{10}	5×10^2	2	unter 1



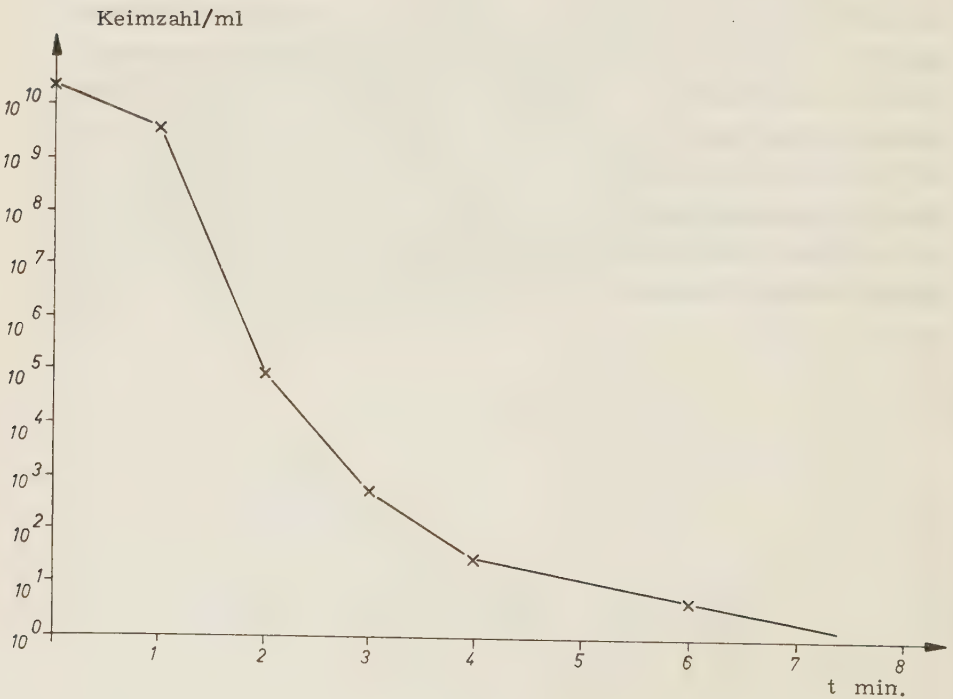
3.2.1.2. Inaktivierungskurve bei 60° C

Die Inaktivierungskurve bei einer Temperatur von 60° C wurde in drei Einzelversuchen ermittelt. Dem Diagramm liegen die Mittelwerte der einzelnen Versuchsergebnisse zugrunde. Für die Inaktivierungskurve bei 60° C gelten die gleichen Voraussetzungen wie für die Inaktivierungskurve bei 98° C. Der Kurvenverlauf ist nur aufgrund der niedrigen Temperatur wesentlich flacher (Abb. 2). Der Anfangstiter der Pasteurellensuspension lag bei $2,6 \times 10^{10}$ Keimen/ml. In der 1. Minute der Erhitzung sank der Titer aufgrund der Steigzeit der Temperatur nur langsam ab. Dem entsprechend flachen Anfangsteil der Inaktivierungskurve schließt sich ein etwas steilerer, ziemlich gleichmäßig abfallender Kurvenabschnitt an bis zu einer Inaktivierungszeit von etwa 5 Minuten. In dieser Zeit vollzog sich die Inaktivierung des größten Teils der Pasteurellen. Die Kurve nähert sich nun der Abszisse und nimmt dabei wieder einen flacheren Verlauf an. Auch bei der Temperatur von 60° C weicht also die für den Impfstamm ermittelte Inaktivierungskurve von einer Reaktion 1. Ordnung ab. Die Bestimmung des genauen Zeitpunktes für das Ende der Inaktivierung war aus den bei der Inaktivierung mit 98° C bereits beschriebenen Gründen nicht möglich. In den Einzelversuchen traten Schwankungen zwischen 6 und 8 Minuten auf. Aus Sicherheitsgründen wurde für die Impfstoffherstellung eine Inaktivierungszeit von 16 Minuten benutzt bei einem Anfangstiter der Pasteurellensuspension von $2 - 3 \times 10^{10}$ Keimen/ml.

Abb. 2

Inaktivierungsdiagramm für Pasteurella multocida bei einer Temperatur von 60° C

Inaktivierungszeit (min.)	0	1	2	3	4	6	8
Keimzahl/ml	$2,6 \times 10^{10}$	4×10^9	$6,6 \times 10^4$	$7,5 \times 10^2$	30	8	unter 1



3.2.2. Ergebnis der Prüfung auf Unschädlichkeit

Die Unschädlichkeit der Impfstoffe wurde an weißen Mäusen bei subkutaner und intraperitonealer Applikation geprüft. Nach subkutaner Verabreichung der Impfstoffe ohne Adjuvantien und mit Viren als Adjuvantien traten teilweise an der Impfstelle bis zu erbsengroße Abszesse auf, welche die Tiere aber im Allgemeinbefinden nicht störten. Beim Formalin-Impfstoff wurde an der Impfstelle in manchen Fällen Haarausfall beobachtet. Impfstoffe mit den Adjuvantien Aluminiumhydroxid und Saponin führten fast durchwegs zu starken Hautreaktionen. An der Impfstelle entstand eine nässende, eitrige Dermatitis. Eine wesentliche Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Mäuse wurde nicht beobachtet.

Intraperitoneal wurden den Mäusen die Impfstoffe-A und -B ohne Adjuvantien verabreicht. Beim Impfstoff-A starb von 4 Mäusen nach 24 Stunden 1 Maus; beim Impfstoff-B starb keine Maus.

3.2.3. Ergebnis der Prüfung auf Immunogenität

3.2.3.1. Aktiver Mäuseschutzversuch

Die Schutzversuche wurden in Anlehnung an die Methode von Ose und Muenster (76) durchgeführt. Das Verfahren war von ihnen zur Prüfung handelsüblicher Pasteurellen-Vakzinen entwickelt worden. Es eignet sich sehr gut zur Feststellung der Wirksamkeit von Impfstoffen gegen homologe und heterologe Erregerstämme. Nach Ansicht von Ose und Muenster geben die im aktiven Mäuseschutzversuch erhaltenen Ergebnisse am ehesten Aufschluß über die Wirksamkeit der Impfstoffe unter Feldbedingungen. Voraussetzung für die Durchführung des Testes ist allerdings, daß die Pasteurellenstämme, die zur Belastung verwendet werden, eine ausgeprägte Mäusepathogenität besitzen. Der Past. mult.-Impfstamm, der in den eigenen Versuchen benutzt wurde, besaß im Vergleich zu den Erregern, die Ose und Muenster zur Belastung verwendeten, nur eine geringe Mäusepathogenität.

Aus diesem Grunde mußte das Challenge-Material statt subkutan intraperitoneal verabreicht und die Dosis auf 0,5 ml erhöht werden.

Der erste Mäuseschutzversuch diente zum Vergleich der immunisierenden Eigenschaften von Pasteurellenimpfstoffen auf der Basis von Erregern, die einerseits mit Formalin und andererseits mit Wärme ($98^{\circ}\text{C}/2\text{ min}$ u. $60^{\circ}\text{C}/16\text{ min}$) inaktiviert worden waren.

Aus den Mortalitätsraten, die im Schutztest bei den ungeimpften und bei den geimpften Mäusen nach der Belastung mit verschiedenen Verdünnungsstufen einer virulenten Past. mult.-Suspension festgestellt worden waren, wurden Dosis-Mortalitäts-Kurven aufgestellt und die Dosis letalis media (LD_{50}) nach der Methode von Spearman-Kärber berechnet. Bei den Kontrolltieren wurde eine Verdünnung des Belastungsmaterials von $10^{-3,3}$ als LD_{50} ermittelt (dies entspricht einer Keimzahl von 2×10^7 pro ml.). Für Mäuse, die mit dem Formalin-Impfstoff geimpft waren, wurde eine LD_{50} von $10^{-1,9}$ und für Tiere, die mit dem Impfstoff-A und -B geimpft waren, eine LD_{50} von $10^{-1,5}$ berechnet. Die Dosis-Mortalitäts-Kurven verlaufen verhältnismäßig flach. Eine Erhöhung der Belastungsdosis rief also jeweils nur eine geringe Zunahme der Mortalität hervor (Abb. 3). Mit Hilfe der Dosis-Mortalitäts-Kurven kann man zu den Belastungsdosen: 1000 LD_{50} , 100 LD_{50} und 1 LD_{50} für die ungeimpften Mäuse die entsprechenden Mortalitätsraten, die bei den ungeimpften und bei den geimpften Mäusen zu erwarten sind, ablesen und miteinander vergleichen. Der 1000fachen LD_{50} entspricht bei den Kontrolltieren und bei den Mäusen, die mit dem Formalin-Impfstoff geimpft waren, eine 100 %ige Mortalität. Dagegen beträgt die Sterblichkeit beim Impfstoff-A etwa 90 % und beim Impfstoff-B ungefähr 80 %. Für die 100fache LD_{50} ergibt sich bei den Kontrolltieren wieder eine fast 100 %ige Letalität, während sie bei den geimpften Mäusen, je nach verabreichtem Impfstoff, zwischen 60 % und 70 % liegt.

Bei einer Belastungsdosis von 1facher LD_{50} , also bei einer Mortalität von 50 % bei den Kontrolltieren, unterscheiden sich die Reaktionen der geimpften Mäuse je nach Impfstoff deutlicher. Das günstigste Ergebnis erziel-

te der Impfstoff-B, bei dem alle Tiere überlebten. Für den Impfstoff-A wurde eine Mortalität von unter 10 % ermittelt. Am schlechtesten schneidet der Formalin-Impfstoff ab, mit einer Sterblichkeit der geimpften Mäuse zwischen 10 % und 20 %.

Die graphische Darstellung der verschiedenen Dosis-Mortalitäts-Kurven (Abb. 3) zeigt, daß eine Interpretation dieser Kurven in bezug auf eine Wertbemessung der Impfstoffe problematisch ist, da die Kurven nicht parallel verlaufen. Die Wirksamkeit der einzelnen Impfstoffe unterscheidet sich je nach Belastungsdosis in verschiedenem Maße. Es kommt teilweise sogar zu einer Umkehrung der Wertverhältnisse. So spricht die Dosis-Mortalitäts-Kurve für den Impfstoff-A nach einer Belastung mit 1000facher LD_{50} für eine bessere Wirksamkeit als für den Impfstoff-B, während nach 1facher LD_{50} der umgekehrte Fall vorliegt. Die Bestimmung der Wirksamkeit der Impfstoffe wurde nach dem Verfahren von Ose und Muenster (76) durchgeführt. Bei dieser Methode wird die LD_{50} bei den geimpften Tieren mit der LD_{50} bei den Kontrolltieren verglichen und der Unterschied der Logarithmen der LD_{50} als Maßstab für die Wirksamkeit verwendet. Für die wärmeinaktivierten Impfstoffe (A und B) wurde nach diesem Auswertungsverfahren ein Schutzwert von jeweils 1,8 ermittelt. Mit dem Formalin-Impfstoff wurde ein Schutzwert von 1,4 erreicht (Tab. 7). Die wärmeinaktivierten Impfstoffe erwiesen sich also untereinander gleichwertig und erzielten sogar ein etwas günstigeres Ergebnis als der Formalin-Impfstoff.

Tabelle 5

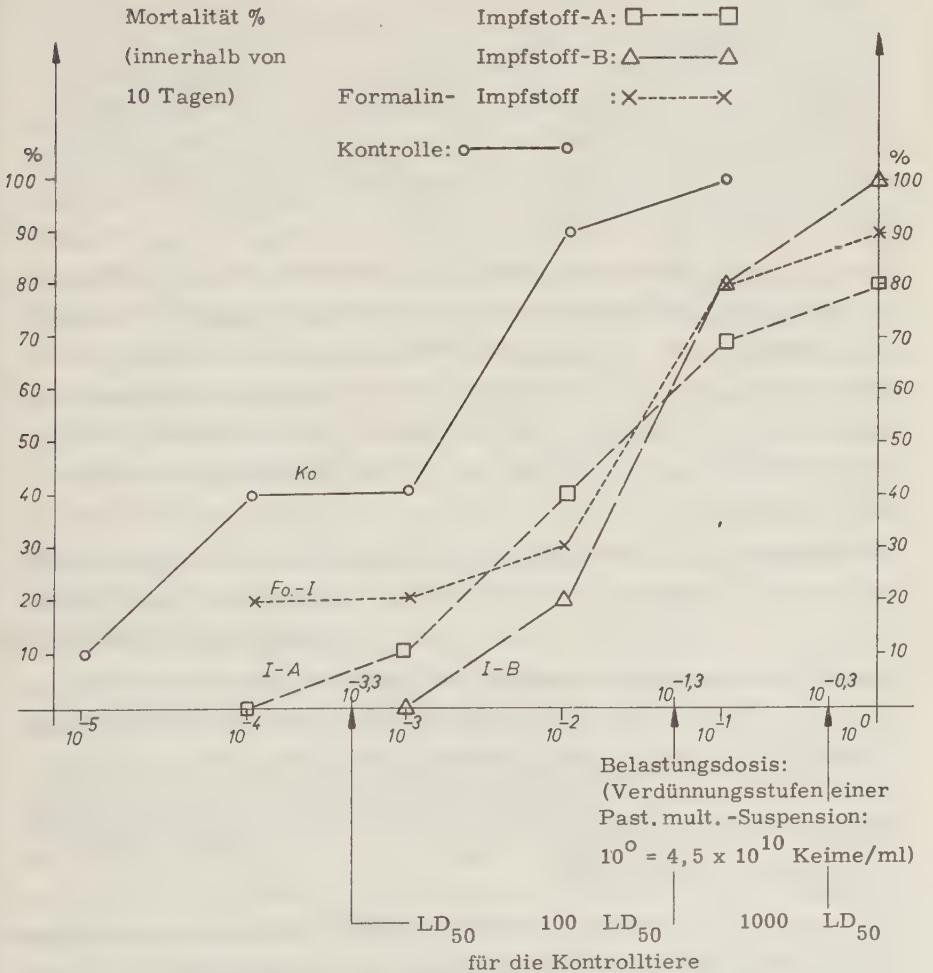
Vergleich der Immunogenität formalininaktivierter und wärmeinaktivierter Pasteurellen im aktiven Mäuseschutzversuch nach Ose und Muenster (76)

Impfstoffe	Belastungs- dosis	Anzahl der Mäuse	Mortalität		LD ₅₀
			absol.	%	
Impfstoff-A (98° C/2 min)	10 ⁰	10	8	80	10 ^{-1,5}
	10 ⁻¹	10	7	70	
	10 ⁻²	10	4	40	
	10 ⁻³	10	1	10	
	10 ⁻⁴	10	0	0	
Impfstoff-B (60° C/16 min)	10 ⁰	10	10	100	10 ^{-1,5}
	10 ⁻¹	10	8	80	
	10 ⁻²	10	2	20	
	10 ⁻³	10	0	0	
	10 ⁻⁴	10	0	0	
Formalin- Impfstoff (0,3 %)	10 ⁰	10	9	90	10 ^{-1,9}
	10 ⁻¹	10	8	80	
	10 ⁻²	10	3	30	
	10 ⁻³	10	2	20	
	10 ⁻⁴	10	2	20	
Kontrolltiere (ungeimpft)	10 ⁰	10	10	100	10 ^{-3,3}
	10 ⁻¹	10	10	100	
	10 ⁻²	10	9	90	
	10 ⁻³	10	4	40	
	10 ⁻⁴	10	4	40	
	10 ⁻⁵	10	1	10	

Abb. 3

Vergleich der Immunogenität formalinaktivierter und wärmeinaktivierter (98° C/2 min u. 60° C/16 min) Pasteurellen im aktiven Mäuseschutzversuch nach Ose und Muenster

Dosis-Mortalitäts-Kurven



Nachdem sich im aktiven Mäuseschutzversuch die Impfstoffe aus wärmeinaktivierten Pasteurellen in ihrer Wirksamkeit dem Formalin-Impfstoff praktisch als gleichwertig erwiesen, wurde in einer zweiten Testreihe versucht, die Immunogenität des Impfstoffes-A, als Modell für einen Pasteurellenimpfstoff aus wärmeinaktivierten Erregern, mit verschiedenen Adjuvantien zu steigern.

Neben den allgemein üblichen Adjuvantien Saponin und Aluminiumhydroxid wurden auch durch Zellkulturpassagen attenuierte Teschen- und Vakzineviren auf immunogenitätsfördernde Eigenschaften im aktiven Mäuseschutztest geprüft. Aus den Ergebnissen des Schutzversuches wurden für die geimpften und ungeimpften Mäuse wie im ersten Versuch Dosis-Mortalitätskurven aufgestellt und die LD_{50} berechnet.

Als LD_{50} wurde für die Kontrolltiere eine Verdünnung des Belastungsmaterials von $10^{-3,6}$ (dies entspricht einer Keimzahl von $4,2 \times 10^7$ /ml) ermittelt. Für Mäuse, die mit dem Impfstoff-A/Saponin geimpft waren, ergab sich eine LD_{50} von $10^{-1,9}$ und für mit Impfstoff-A/Aluminiumhydroxid geimpfte Mäuse wurde eine LD_{50} von 10^{-2} festgestellt. Beim Impfstoff-A/Vakzinevirus (FHE) betrug sie $10^{-1,8}$ und beim Impfstoff-A/Vakzinevirus (ENS) $10^{-1,7}$ (Tab. 7).

Die Mortalitätsraten der Mäuse nach den verschiedenen Belastungsdosen führten zu einem verhältnismäßig flachen Verlauf der Dosis-Mortalitäts-Kurve (Abb. 4) bei den ungeimpften Kontrolltieren. Bei den geimpften Mäusen stellte sich vor allem im Bereich niedriger Belastungsdosen ein steilerer Kurvenverlauf ein. Das bedeutet, daß der Unterschied zwischen geimpften und ungeimpften Mäusen erst bei diesen Belastungsdosen deutlich wird. Die Dosis-Mortalitäts-Kurve der mit Impfstoff-A/Teschenvirus geimpften Mäuse liegt der Kurve der Kontrolltiere am nächsten. Dies zeigt, daß dieser Impfstoff den geringsten Schutz gewährt.

Die Kurve für den Impfstoff-A/Vakzinevirus (ENS) liegt dagegen am weitesten von der Kurve der Kontrolltiere entfernt. Dieser Impfstoff hat also die größte Wirksamkeit von den hier getesteten Vakzinen. Die Impfstoffe mit den Ad-

juvantien Aluminiumhydroxid, Saponin und Vakzinevirus (FHE) liegen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zwischen diesen beiden Vakzinen. Ein Vergleich der Mortalitätsraten bei den ungeimpften und bei den geimpften Mäusen ergibt folgendes Bild (Abb. 4). Bei einer Belastungsdosis von 1000 LD_{50} für die Kontrolltiere wird an Hand der Dosis-Mortalitäts-Kurven für die ungeimpften Mäuse und für die Mäuse, die mit Impfstoff-A/Saponin oder Impfstoff-A/Teschenvirus geimpft waren, eine Mortalität von 100 % abgelesen. Bei den Tieren, die mit den übrigen Impfstoffen geimpft waren, liegen die Sterblichkeitsraten zwischen 90 % und 100 %. Nach 100 LD_{50} beträgt die Mortalität der Kontrolltiere wieder fast 100 %, während die Mortalität-Kurve bei den geimpften Tieren niedrigere Werte anzeigt. Dabei treten deutliche Unterschiede je nach dem verabreichten Impfstoff auf. Am schlechtesten schneidet hier der Impfstoff-A/Aluminiumhydroxid und Impfstoff-A/Teschenvirus ab, mit einer Mortalität zwischen 70 % und 80 %. Bei Mäusen, die mit Impfstoff-A/Saponin und mit Impfstoff-A/Vakzinevirus (FHE) geimpft waren, erreicht die Mortalität Werte um 70 %. Den besten Schutz gewährt bei dieser Belastungsdosis der Impfstoff-A/Vakzinevirus (ENS), bei dem die Sterblichkeit zwischen 50 % und 60 % beträgt. Einer Belastung mit LD_{50} entsprechen auf den Dosis-Mortalitäts-Kurven bei den geimpften Mäusen annähernd gleiche Sterblichkeitsraten. Bei den Impfstoffen-A mit den Adjuvantien Teschenvirus und Vakzinevirus (ENS) liegt die Mortalität unter 10 %. Bei den Impfstoffen-A mit den Adjuvantien Aluminiumhydroxid, Saponin und Vakzinevirus (FHE) überleben alle Tiere.

Nach der Belastungsdosis von LD_{50} ist also der Unterschied zwischen Impflingen und Kontrolltieren relativ am größten.

Die Auswertung des Schutzversuches nach dem Verfahren von Ose und Muenster ergibt für die Impfstoffe-A mit den Adjuvantien Aluminiumhydroxid und Saponin einen Schutzwert von 1,6 und 1,7. Das beste Ergebnis erzielte der Impfstoff-A/Vakzinevirus (ENS) mit einem Schutzwert von 1,9. Bei dem Impfstoff-A/Vakzinevirus (FHE) beträgt der Schutzwert 1,8. Das schlechteste Ergebnis erreichte Impfstoff-A/Teschenvirus mit einem Schutzwert von 1,4 (Tab. 7).

Tabelle 6

Untersuchung des Einflusses verschiedener Adjuvantien auf die Immunogenität des Past. mult. -Impfstoffes-A im aktiven Mäuseschutzversuch nach Ose und Muenster (76)

Impfstoffe	Belastungs- dosis	Anzahl der Mäuse	Mortalität		LD ₅₀
			absol.	%	
<u>Impfstoff-A/ Aluminium- hydroxid</u>	10 ⁰	10	10	100	10 ⁻²
	10 ⁻¹	10	8	80	
	10 ⁻²	10	7	70	
	10 ⁻³	10	0	0	
<u>Impfstoff-A/ Saponin</u>	10 ⁰	10	10	100	10 ^{-1,9}
	10 ⁻¹	10	10	100	
	10 ⁻²	10	4	40	
	10 ⁻³	10	0	0	
<u>Impfstoff-A/ Teschenvirus</u>	10 ⁰	10	10	100	10 ^{-2,2}
	10 ⁻¹	10	10	100	
	10 ⁻²	10	6	60	
	10 ⁻³	9	1	11	
<u>Impfstoff-A/ Vakzinevirus (FHE)</u>	10 ⁰	10	10	100	10 ^{-1,8}
	10 ⁻¹	10	9	90	
	10 ⁻²	10	4	40	
	10 ⁻³	10	0	0	
<u>Impfstoff-A/ Vakzinevirus (ENS)</u>	10 ⁰	10	10	100	10 ^{-1,7}
	10 ⁻¹	10	8	80	
	10 ⁻²	10	3	30	
	10 ⁻³	10	1	10	
Kontrolltiere (ungeimpft)	10 ⁰	10	10	100	10 ^{-3,6}
	10 ⁻¹	10	10	100	
	10 ⁻²	10	9	90	
	10 ⁻³	10	6	60	
	10 ⁻⁴	10	4	40	
	10 ⁻⁵	10	2	20	

Abb: 4

Untersuchung des Einflusses verschiedener Adjuvantien auf die Immunogenität des Past. mult. -Impfstoffes-A im aktiven Mäuseschutzversuch nach Ose und Muenster (76)

Dosis-Mortalitäts-Kurven

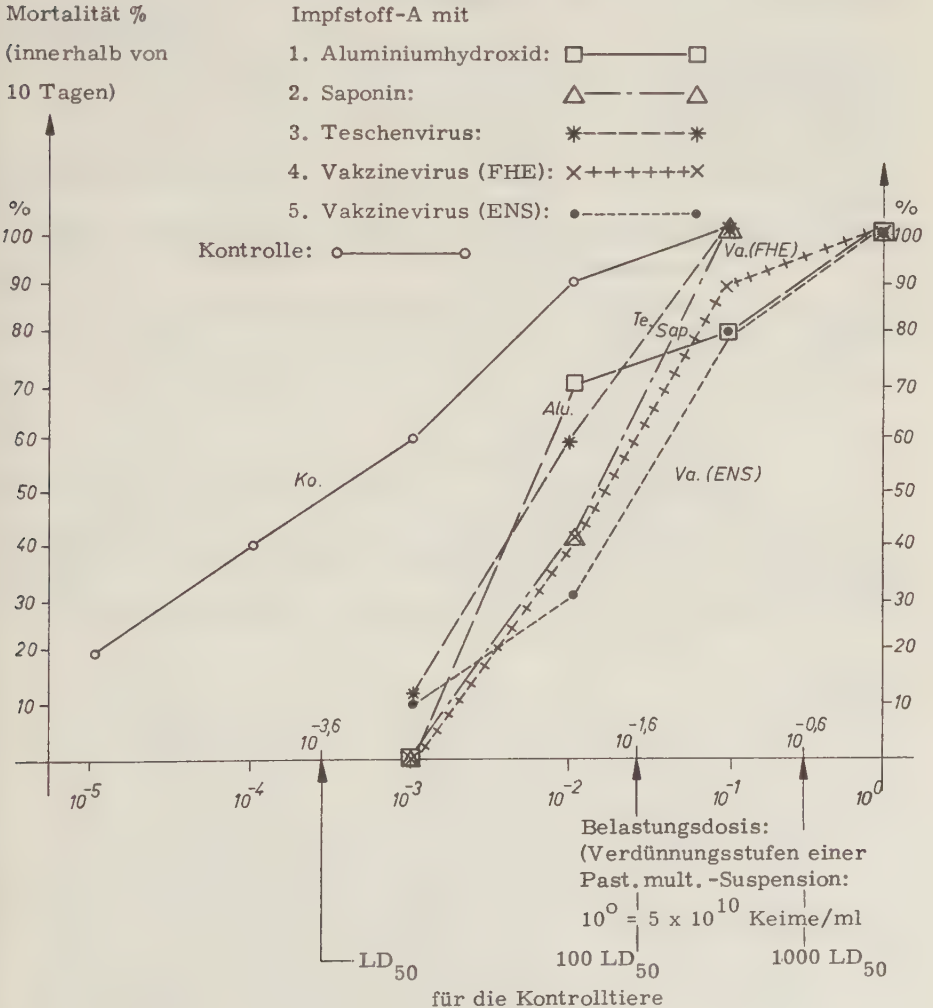
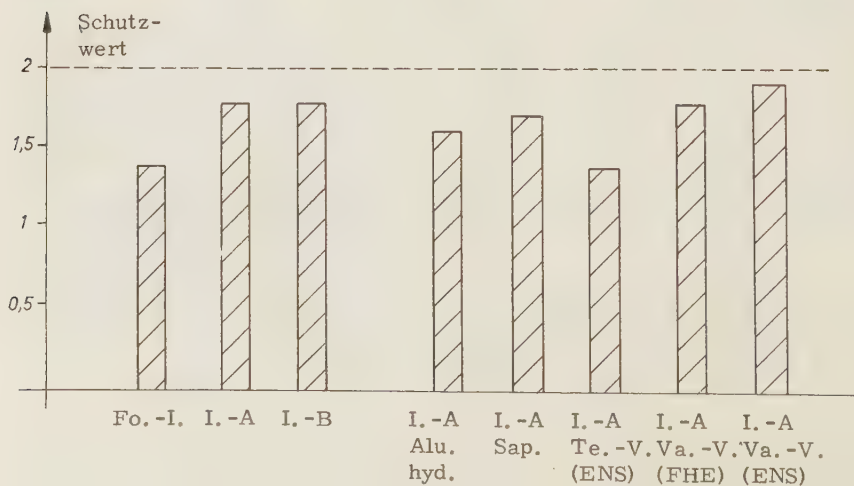


Tabelle 7

Schutzwerte der verschiedenen Pasteurella multocida-Impfstoffe

(ermittelt im aktiven Mäuseschutzversuch nach dem Verfahren von Ose und Muenster (76))

Impfstoffe		geschätzte LD ₅₀	Schutzwert (Logs protection)
Formalin-Impfstoff		10 ^{-1,9}	1,4
Impfstoff-A (98° C)		10 ^{-1,5}	1,8
Impfstoff-B (60° C)		10 ^{-1,5}	1,8
Kontrolle		10 ^{-3,3}	
Impfstoff-A mit den Adjuvantien:	1. Aluminium- hydroxid	10 ⁻²	1,6
	2. Saponin	10 ^{-1,9}	1,7
	3. Teschen- virus	10 ^{-2,2}	1,4
	4. Vakzinevirus (FHE)	10 ^{-1,8}	1,8
	5. Vakzinevirus (ENS)	10 ^{-1,7}	1,9
Kontrolle		10 ^{-3,6}	



3. 2. 3. 2. Antikörpertiter nach Impfung mit den verschiedenen Pasteurella multocida-Impfstoffen

Die Bildung humoraler Antikörper nach Impfung mit dem Past. mult. - Formalin-Impfstoff und mit den Impfstoffen-A und -B, wurde an Serumpools von jeweils fünf Mäusen untersucht, die a) am 7. Tag, b) am 14. Tag nach der ersten Impfung und c) 14 Tage nach der Wiederholungsimpfung gewonnen worden waren. Der Formalin-Impfstoff und der Impfstoff-A führten auch nach der Boosterimpfung zu keinem nachweisbaren Antikörpertiter. Beim Impfstoff-B wurde durch die Wiederholungsimpfung ein Titer von 1:16 erreicht. Die Grundimpfung rief keinen nachweisbaren Titer hervor. Nach der Belastung der geimpften Mäuse im Rahmen des ersten Schutzversuches konnten in allen Serumpools überlebender Mäuse spezifische Antikörper festgestellt werden. Bei Mäusen, die mit dem Impfstoff-A geimpft waren, lag der mittlere Antikörpertiter, 4 Wochen nach der Belastung mit den Kulturverdünnungen 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} , bei einem Wert von 1:32. In den Seren von Mäusen, die mit dem Impfstoff-B geimpft waren, wurden Titer mit einem Mittelwert von 1:25 gefunden. Die Seren der Mäuse, die mit dem Formalin-Impfstoff geimpft waren, wiesen Titer mit einem Mittelwert von 1:13 auf. Ein Vergleich der mittleren Antikörpertiter mit dem Schutzwert der entsprechenden Impfstoffe läßt eine gewisse Parallelität erkennen. Bei den überlebenden ungeimpften Kontrolltieren aus dem Schutzversuch wurde nach der Belastung mit den Kulturverdünnungen 10^{-3} bis 10^{-5} ein mittlerer Antikörpertiter von 1:8 festgestellt. (Abb. 5)

Der Antikörpertiter bei Mäusen, die mit dem Impfstoff-A nach Zusatz der verschiedenen Adjuvantien geimpft worden waren, wurde nur in Serumpools solcher Tiere untersucht, die im Rahmen des zweiten Schutzversuches eine Belastung mit den Past. mult. -Kulturverdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} überlebt hatten. In Seren von Mäusen, die mit Impfstoff-A/Aluminiumhydroxid oder Impfstoff-A/Vakzinevirus (FHE) geimpft worden waren, konnten 2 Wochen nach der Belastung Titer mit einem Mittelwert von jeweils 1:32 nachgewiesen werden. Bei Mäusen, die mit Impfstoff-A/Saponin geimpft worden waren, lag der mittlere Antikörpertiter bei 1:64. Noch höhere Titer mit

einem Mittelwert von jeweils 1 : 90 wurden in Serumpools von Tieren gefunden, die mit dem Impfstoff-A/Vakzinevirus (ENS) bzw. mit dem Impfstoff-A/Teschenvirus geimpft worden waren. Ein Vergleich der mittleren Antikörpertiter mit den Schutzwerten der entsprechenden Impfstoffe zeigt, daß dem relativ hohen Antikörpertiter bei Impfstoff-A/Teschenvirus ein verhältnismäßig geringer Schutzwert gegenübersteht, während bei Impfstoff-A/Vakzinevirus (FHE) der umgekehrte Fall vorliegt. Die Seren von überlebenden Kontrolltieren aus dem zweiten Schutzversuch, belastet mit den Kulturverdünnungen 10^{-3} bis 10^{-5} , enthielten keine nachweisbaren Antikörpertiter (Abb. 6).

Abb. 5

Mittlerer Antikörpertiter von Mäusen nach Impfung mit verschiedenen
Past. mult. -Impfstoffen und nach der Belastung im Schutzversuch

		Impfstoff-A	Impfstoff-B	Formalin- impfstoff	ungeimpfte Kontroll- tiere
Antikör- pertiter	7 Tage post. vacc.	0	0	0	0
	14 Tage post vacc.	0	0	0	
	14 Tage post revacc.	0	1:16	0	
	4 Wo. nach Belastung	1:32	1:25	1:13	1:8

Antikörper-
titer

$\log_{10}$

(4 Wo. nach
Belastung)

Schutzwert
der Impfstoffe

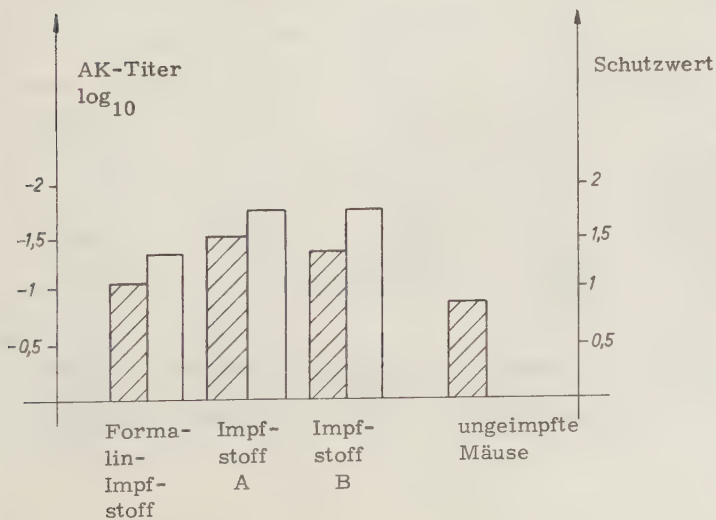


Abb. 6

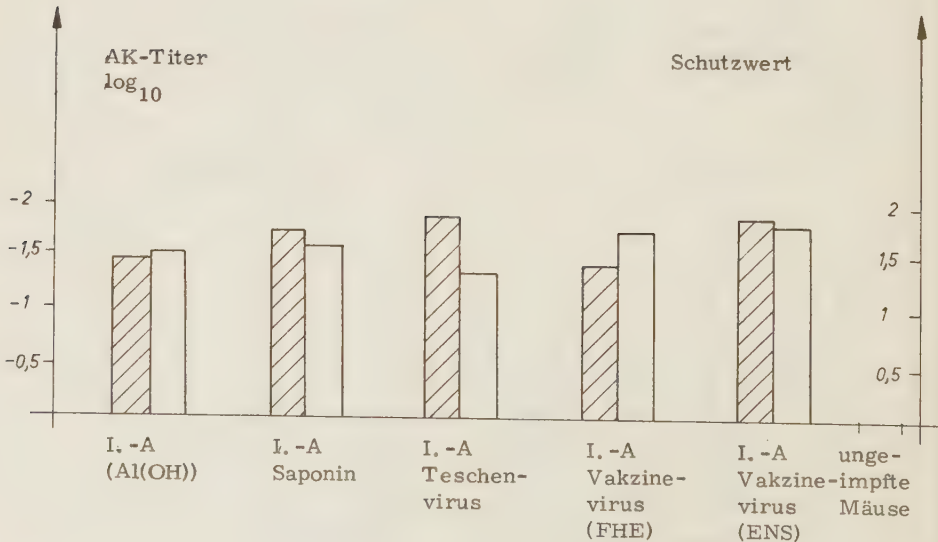
Mittlerer Antikörpertiter von Mäusen nach der Belastung (im Mäuseschutzversuch) im Anschluß an eine Impfung mit einer Past. mult. -Vakzine mit verschiedenen Adjuvantien

	Impf- stoff-A/ Saponin	Impf- stoff-A/ Alu. hyd.	Impf- stoff-A/ Teschenv.	Impf- stoff-A/ Vakz. FHE	Impf- stoff-A/ Vakz. ENS	ungeimpfte Mäuse
Antikör- pertiter 2 Wo. n. Belast.	1 : 64	1 : 32	1 : 90	1 : 32	1 : 90	0

Antikörper-
titer
 $\log_{10}$



Schutzwert
der Impfstoffe



4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde am Modell eines Past. mult. -Stammes untersucht, inwieweit sich zur Impfstoffherstellung bei der Spezies Pasteurella die übliche Formalininaktivierung durch eine Wärmeinaktivierung ersetzen läßt. Die Wärmeinaktivierung bietet den Vorteil, daß eine Reinigung der Keimsuspension zur Entfernung des Formalins nicht nötig ist. Dadurch wird nicht nur ein Verlust an Bakterienzellen, der durch den Waschvorgang sehr erheblich sein kann, vermieden, sondern es bleiben auch Kapselsubstanzen und Antigene, die im Kulturmedium in Lösung gegangen sind (95), erhalten.

Die Wärmeinaktivierung von Bakterien im Rahmen der Impfstoffherstellung soll möglichst schonend, d. h. ohne Zerstörung antigenwirksamer Bestandteile und Strukturen der Zellen durchgeführt werden. Dazu ist nach Raettig et al. (55) eine rasch einsetzende und möglichst kurz dauernde Wärmeeinwirkung auf die Bakterien bei den auch in dieser Arbeit gewählten Temperaturstufen von 60° C und 98° C besonders geeignet. In den eigenen Versuchen wurde für die Temperatur 60° C eine Mindestzeit von 6 - 8 Minuten und für 98° C eine Mindestzeit von 40 - 60 Sekunden ermittelt. Da die Wärmeinaktivierung durch zahlreiche Faktoren beeinflußt wird, die sowohl die Züchtung der Bakterien, als auch die Technik der Hitzeinaktivierung betreffen und die kaum völlig konstant gehalten werden können, wurden die ermittelten Mindestzeiten verdoppelt, so daß eine sichere Inaktivierung der Pasteurellen bei der Impfstoffherstellung gewährleistet war. Die Inaktivierungszeit wurde für den "98° C-Impfstoff" auf 2 Minuten und für den "60° C-Impfstoff" auf 16 Minuten festgelegt (Ausgangskeimzahl von $2 - 3 \times 10^{10}$ Keimen/ml). Bei jeder Änderung der Ausgangskeimzahl des Pasteurellen-Stammes, der Züchtungsmethode usw. wird es notwendig, die Mindestinaktivierungszeit neu zu bestimmen.

Man kann für die Wärmeinaktivierung bei Bakterienfamilien keine allgemein gültigen Aussagen machen.

Bei der Auswertung der Mäuseschutzversuche schnitten die beiden Impfstoffe aus wärmeinaktivierten Pasteurellen geringgradig besser als der Formalinimpfstoff ab. Beide Impfstoffe erreichten Schutzwerte von 1,8, während der

Formalinimpfstoff nur einen Wert von 1,4 erzielte. Wenn auch diesem geringen Unterschied keine große Bedeutung beigemessen werden kann, so zeigt das Ergebnis doch, daß die Wärmeinaktivierung zur Impfstoffherstellung mindestens ebenso gut geeignet ist wie die Formalininaktivierung. Alle drei geprüften Impfstoffe erreichten aber nicht den von Ose und Muenster geforderten Schutzwert von mindestens 2. Für dieses Phänomen kommen verschiedene Ursachen, die wahrscheinlich auf Eigenschaften des Impfstammes beruhen, in Frage. *Pasteurella multocida*-Stämme sind in ihren immunisierenden Eigenschaften sehr variabel. Zahlreiche Stämme induzieren beim Wirtstier keine, oder nur eine schwache Immunität. Dies scheint vor allem bei Stämmen der Fall zu sein, die aus nicht spezifischen Pasteurellosen, bei denen die Pasteurellen als Sekundärerreger bzw. fakultativ pathogene Keime auftreten, isoliert werden. Es gibt aber kaum Kriterien, die ohne weiteres erkennen lassen, ob sich ein isolierter Stamm in einer Phase mit gut immunisierender Aktivität befindet oder nicht. Erst im Tierversuch werden diese Eigenschaften deutlich. Möglicherweise besaß der *Pasteurella multocida*-Impfstamm, der in dieser Untersuchung benützt wurde, von Anfang an nur eine geringe Immunogenität. Die Immunogenität kann aber auch durch die lange Kultivierung des Stammes verlorengegangen oder abgeschwächt worden sein. Der Stamm wurde bereits 1971 isoliert und seitdem auf Blutplatten weitergezüchtet. Bei *Pasteurella multocida* ist aber die Erhaltung der Antigenität unter Laborbedingungen im allgemeinen nur mit speziellen Konservierungsverfahren zu erreichen.

Pasteurella multocida-Stämme variieren auch in ihrer Mäusepathogenität. Der hier benutzte Stamm besaß nur eine geringe Mäusepathogenität. Aus diesem Grunde mußten im Schutzversuch zur Belastung sehr hohe Keimkonzentrationen verwendet werden. Daraus ergibt sich die Gefahr, daß die Mortalität der Mäuse bei den höheren Belastungsdosen zum großen Teil auf der Toxizität dieser Keimsuspension beruht und weniger auf einer Septikämie im Rahmen eines Infektionsgeschehens, bei dem für die Immunitätsmechanismen günstigere Abwehrmöglichkeiten bestehen. Dies ist vielleicht auch eine Erklärung dafür, daß im Schutzversuch der Unterschied zwischen geimpften und

nicht geimpften Mäusen erst bei niedrigen Belastungsdosen deutlich wird.

Die Prüfung dieser Fragen hätte jedoch den Rahmen dieser Untersuchung gesprengt, in der es grundsätzlich um das Problem ging, ob die Wärmeinaktivierung (zur Herstellung von Pasteurellen-Impfstoffen) die Formalininaktivierung ersetzen kann.

Durch Zusatz verschiedener Adjuvantien zum Impfstoff-A konnte keine Erhöhung des Schutzwertes im aktiven Mäuseschutzversuch erreicht werden. Die Ursache für das Ausbleiben einer Wirksamkeitssteigerung durch die allgemein üblichen und in ihrer Wirkungsweise vielfach beschriebenen Adjuvantien Aluminiumhydroxid und Saponin ließ sich nicht klären. Allerdings konnten auch Danielson et al. (33) mit Alaun (Aluminiumverbindung) die Wirksamkeit von Pasteurellenimpfstoffen bei kleinen Versuchstieren nicht erhöhen.

Die in Anlehnung an die Arbeit von Bandlow (9) als Adjuvantien verwendeten Viren führten ebenfalls zu keiner Steigerung des Schutzwertes von Impfstoff-A. Beim Impfstoff-A/Teschenvirus trat sogar eine Verschlechterung ein, während beim Impfstoff-A/Vakzinevirus (ENS) eine minimale Verbesserung des Schutzwertes von 1,8 auf 1,9 stattfand. Die Unterschiede im Schutzwert der einzelnen Impfstoffe sind aber zu gering, um daraus bereits gültige Schlüsse auf die Wirksamkeit dieser Viren als Adjuvantien ziehen zu können.

Außer im aktiven Mäuseschutzversuch wurde auch mit Hilfe der indirekten Hämagglutination versucht, Aufschlüsse über die Immunogenität der Pasteurella multocida-Impfstoffe zu gewinnen. Dabei war es allein nach Impfungen mit dem Impfstoff-B möglich, spezifische Antikörper nachzuweisen. Bei allen anderen Impfstoffen traten Antikörper nur nach Belastung mit lebenden Past. mult.-Keimen auf. Vier Wochen nach der Belastung wiesen neben den geimpften Mäusen auch die ungeimpften Kontrolltiere Antikörper auf. Der Titer lag aber deutlich unter dem der geimpften Tiere. Der Zusatz von Adjuvantien zum Impfstoff-A führte bei den Adjuvantien Saponin, Teschenvirus und Vakzinevirus (ENS) zu einer deutlichen Steigerung der Antikörpertiter, während sich bei Aluminiumhydroxid und Vakzinevirus (FHE) keine Titer-Erhöhung ergab. Die untersuchten Kontrolltiere erreichten 14 Tage nach

Challenge keine nachweisbaren Antikörper. Dies deutet darauf hin, daß die immunologische Reaktion der Mäuse nach Auseinandersetzung mit dem *Pasteurella multocida*-Impfstamm nur langsam in Gang kam. Möglicherweise ist eine bessere Immunisierung der Mäuse zu erreichen, wenn die Boosterimpfung in einem größeren Abstand als 14 Tage zur Grundimpfung durchgeführt wird. Ein Vergleich der im aktiven Mäuseschutzversuch erhaltenen Schutzwerte mit den Ergebnissen der indirekten Hämagglutination zeigt, daß eine Parallelität zwischen Antikörpertiter und Schutzwert nur mit Einschränkungen besteht.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im aktiven Mäuseschutzversuch und in der indirekten Hämagglutination wurde vergleichend die Immunogenität von *Pasteurella multocida*-Impfstoffen auf der Basis formalininaktivierter und wärmeinaktivierter Erreger untersucht. Geprüft wurde ein Formalinimpfstoff und zwei Impfstoffe (A und B) aus Pasteurellen, die durch Erhitzen auf 98° C für 2 Minuten (A) und auf 60° C für 16 Minuten (B) inaktiviert worden waren. Die Impfstoffe wurden subkutan zweimal im Abstand von 14 Tagen appliziert.

Die drei untersuchten Impfstoffe waren in ihrer Wirksamkeit im aktiven Mäuseschutzversuch praktisch gleichwertig. Der Schutzwert (Methode von Ose und Muenster) lag beim Formalin-Impfstoff bei 1,4, bei den Impfstoffen-A und -B bei 1,8.

Durch Zusatz verschiedener Adjuvantien (Aluminiumhydroxid, Saponin und über Zellkulturpassagen attenuiertes Teschen- und Vakzinevirus) zum Impfstoff-A konnte keine wesentliche Erhöhung des Schutzwertes erreicht werden.

Nach der Belastung mit virulenten *Pasteurella multocida*-Keimen im Mäuseschutztest wiesen die Seren von Mäusen, die mit den Impfstoffen ohne Adjuvantien geimpft waren, durchschnittlich niedrigere Antikörpertiter auf, als die Seren der mit Impfstoff-A und Adjuvantien vakzinierten Mäuse. Vor der Belastung der Mäuse gelang der Nachweis von Antikörpern nur in Seren von Tieren, die mit Impfstoff-B geimpft waren. Bei den ungeimpften Kontrolltieren waren 2 Wochen nach der Belastung noch keine Antikörper nachweisbar, während nach 4 Wochen ein geringer Titer festgestellt wurde.

SUMMARY

Using the mouse protection test and the indirect haemagglutination test comparison were made between the immunogenicity of *Pasteurella multocida* vaccines on the basis of formalin inactivated and heat inactivated agents. The following vaccines were examined: one formalin vaccine and two *pasteurella* vaccines (A and B), which had been inactivated by heat, one (A) for two minutes to temperature of 98°C , the other for 16 minutes to 60°C . The vaccines were given twice subcutaneously within a 2 weeks interval.

The effectiveness in the mouse protection test was comparable in all three vaccines used. The logs protection (method of Ose and Muenster) was for the formalin vaccine at 1.4, for the vaccines A and B at 1.8. No considerable raise of the logs protection could be obtained by addition to vaccine A of various adjuvants (aluminium hydroxide, saponin, Teschen virus and vaccinia virus both attenuated by cell culture passages).

After having been challenged with virulent *Pasteurella multocida* the sera of mice vaccinated with vaccines without adjuvants showed lower antibody titres on the average than the sera of mice vaccinated with vaccine A plus adjuvants. Before challenge the evidence of antibodies could only be produced in sera of mice vaccinated with vaccine B. No evidence of antibody titres could be produced in the sera of nonvaccinated mice two weeks after the challenge, whereas after four a low titre could be detect.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Bain, R. V. S.

Vaccination against haemorrhagic septicaemia of bovines
Nature 173, 584, 1954a
- (2) Bain, R. V. S.

Immunization against bovine pasteurellosis
Bull. Off. Int. Epiz. 42, 256, 1954 b
- (3) Bain, R. V. S.
Jones, R. F.

Studies on haemorrhagic septicaemia of cattle
III. Production of adjuvant vaccine
Br. vet. J. 111, 30, 1955
- (4) Bain, R. V. S.

Studies on haemorrhagic septicaemia of cattle
IV. A preliminary examination of the antigens of Pasteurella multocida type I
Br. vet. J. 111, 492, 1955
- (5) Bain, R. V. S.

Studies on haemorrhagic septicaemia of cattle
VI. Experiments with oil-adjuvant-vaccine
Br. vet. J. 112, 115, 1956
- (6) Bain, R. V. S.
Jones, R. F.

The production of dense cultures of Pasteurella multocida
Br. vet. J. 114, 215, 1958
- (7) Bain, R. V. S.

"Haemorrhagic septicaemia of cattle"
Observations on some recent work
Br. vet. J. 115, 365, 1959
- (8) Bain, R. V. S.

Hemorrhagic septicemia
FAO (UN) Rome 1963
- (9) Bandlow, G.
Kielsing, F.
Thomssen, R.

Viren als immunologische Adjuvantien für die Produktion von Antikörpern gegen Wirtszellantigene
Arch. ges. Virusforsch. 34, 287, 1971
- (10) Batu, A.

(Anaphylactic reactions in cattle as a result of the vaccination campaign against haemorrhagic septicaemia in 1964)
Türk. vet. Hekim. Dern. Derg. 35, 463 1965
Vet. Bull. 36, 2088, 1966

- (11) Batu, A. (A new haemorrhagic septicaemia vaccine prepared from aerated cultures)
Pendik Vet. Kontrol Ara. Enst. Derg. 1,
114, 1968
Vet. Bull. 39, 947, 1969
- (12) Baxi, K.K.
Blobel, H.
Schaumann, W. Untersuchungen über die Antigenstruktur von *Pasteurella multocida*
Zbl. Vet. Med., Reihe B, 17, Heft 4, 29
1970
- (13) Bierer, B.W.
Derieux, W.T. Immunologic response of turkeys to an avirulent *Pasteurella multocida* vaccine in the drinking water
2. Duration of immunity
Poultry Science 51, 1402, 1972
- (14) Cameron, C.M.
Smit, G. Immune response of rabbits, mice and sheep to polyvalent *Pasteurella* vaccine
Onderstepoort J. vet. Res. 37, 217, 1970
- (15) Carter, G.R. Studies on *Pasteurella multocida*
I. A hemagglutination test for the identification of serological types
Am. J. Vet. Res. 16, 481, 1955
- (16) Carter, G.R. Studies on *Pasteurella multocida*
II. Identification of antigenic characteristics and colonial variants
Am. J. Vet. Res. 18, 210, 1957
- (17) Carter, G.R. Studies on *Pasteurella multocida*
III. A serological survey of bovine and porcine strains from various parts of the world
Am. J. Vet. Res. 18, 437, 1957
- (18) Carter, G.R. Studies on *Pasteurella multocida*
A bacterin for the prevention of shipping fever in Canada
Vet. Med. 52, 254, 1957
- (19) Carter, G.R. A new serological type of *Pasteurella multocida* from central Africa
Vet. Rec. 73, 1052, 1961
- (20) Carter, G.R. The preparation and use of vaccines for the prevention of pasteurellosis
Can. vet. J. 2, 96, 1961

- (21) Carter, G.R.
Rappay, D.E. Formalinized erythrocytes in the hemagglutination test for typing *Pasteurella multocida*
Br. vet. J. 118, 289, 1962
- (22) Carter, G.R. Proposed modification of the serological classification of *Pasteurella multocida*
Vet. Rec. 75, 1264, 1963
- (23) Carter, G.R. Correlation between haemagglutinating antibody and mouse protection in anti-pasteurella (*Pasteurella multocida*) sera
Can. J. Microbiol. 10, 753, 1964 b
- (24) Carter, G.R. Coastal plain exper. Stat. Pasteurellosis *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*
Advanc. vet. Sci. 11, 321, 1967
- (25) Carter, G.R. Improved hemagglutination test for identifying type A strains of *Pasteurella multocida*
Appl. Microbiol. 24, 162, 1972
- (26) Carter, G.R. Agglutinability of *Pasteurella multocida* after treatment with hyaluronidase
Vet. Rec. 91, 150, 1972
- (27) Cavalli-Sforza Biometrie
Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik
Stuttgart 1969
- (28) Cerruti, C.G.
Quesada, A. (Studies on vaccination of buffaloes against pasteurellosis)
Clinica vet., Milano 89, 233, 1966
Vet. Bull. 37, 460, 1967
- (29) Cerruti, C.G.
Quesada, A.
Roperti, C.
Acone, P. (Field trials with avianized pasteurella vaccine in buffaloes)
Atti. Soc. ital. Sci. vet. 20, 854, 1966
Vet. Bull. 37, 3557, 1967
- (30) Cerruti, C.G.
Quesada, A.
De Anseris, P.
Roperti, C.
Acone, P.
Vaccaro, A. (Use of avianized vaccine against *Pasteurella* infection of buffaloes)
Atti. Soc. ital. Sci. vet. 21, 827, 1967
Vet. Bull. 39, 24, 1969

- (31) Cerruti, C.G.
Quesada, A.
De Anseris, P.
Roperti, C.
Acone, P.
Vaccaro, A.

(Practical application of avianized vaccine against pasteurellosis in buffaloes)
Clinica vet., Milano 91, 71, 1966
Vet. Bull. 38, 3930, 1968
- (32) Cimoch, P.F.

(Typisierung der Pasteurellen nach Eigenschaften der O-Antigene)
Veterinarija Moskova 46, 41, 1970
Ldw. Zbl. 4-70/10-0278, 1970
- (33) Danielson, I.S.
Bolton, R.

Laboratory studies of the immunizing value of H.S. bacterin and blackleg bacterin
Proc. U.S. Livestock Sanit. Assoc. 54, 266 1950 zit. nach Sinha (93)
- (34) Engelbrecht, H.

Present status of immunization procedures for pasteurellosis
J.A.V.M.A. 152, 881, 1968
- (35) Frank, H.

Comments on immunization procedures for pasteurellosis
J.A.V.M.A. 152, 884, 1968
- (36) Gale, C.
Smith, H.R.

Studies on shipping fever of cattle
I. The experimental exposure of cattle with various cultures of Pasteurella
Am. J. Vet. Res. 19, 815, 1958
- (37) Gale, C.
Hamdy, A.H.
Trapp, A.L.

Studies on an experimental vaccine for prophylaxis of shipping fever
J.A.V.M.A. 142, 884, 1963
- (38) Gale, C.

Role of parainfluenza-3 in cattle
J. Dairy Sci. 53, 621, 1970
- (39) Geneidy, A.A.
Lofty, O.
El-Affenby, A.M.

Control of haemorrhagic septicaemia with special reference to the new oil adjuvant vaccine
J. Arab. vet. med. Ass. 27, 121, 1967
- (40) Golebiowski, S.

Behaviour of some immunological indices of normal bovine serum and after immunization with Pasteurella multocida
Bull. of the Veterin. Inst. in Pulawy 15, 1, 1971
Vet. Bull. 42, 4447, 1972

- (41) Gossett, F. Serologic response to a formalized and
Gale, C. adjuvanted parainfluenza-3 antigen in calves
Gregory, R.P. J.A.V.M.A. 157, 174, 1970
Matsuoka, T.
- (42) Hamdy, A.H. Experimental transmission of shipping
Trapp, A.L. fever in calves
Gale, C. Am. J. Vet. Res. 24, 287, 1963
King, N.B.
- (43) Hamdy, A.H. Experimental immunization of cattle against
Trapp, A.L. shipping fever
Cornell vet. 54, 41, 1964
- (44) Hamdy, A.H. Immunization of cattle against shipping
Trapp, A.L. fever:
experimental exposure
Am. J. Vet. Res. 25, 1648, 1964
- (45) Hamdy, A.H. Attempt at immunization of cattle against
King, N.B. shipping fever:
Trapp, A.L. a field trial
Am. J. Vet. Res. 26, 897, 1965
- (46) Heddleston, K.L. Dissociation of a fowl cholera strain of
Watko, L.P. Pasteurella multocida
Rebers, P.A. Avian Dis. 8, 649, 1964
- (47) Heddleston, K.L. Studies on the Transmission and etiology
Robert, B.S. of bovine shipping fever
Reisinger, C. Am. J. Vet. Res. 23, 94, 1962
Lawrence, P.
Watko, B.S.
- (48) Heddleston, K.L. Experimental pasteurellosis:
Rhoades, K.R. comparative studies on Pasteurella
Rebers, P.A. multocida from Asia, Africa, and North
America
Am. J. Vet. Res. 28, 1003, 1967
- (49) Heddleston, K.L. Fowl cholera: active immunity induced
Rebers, P.A. in chickens and turkeys by oral administra-
tion of killed Pasteurella multocida
Avian Dis. 12, 129, 1968
- (50) Heddleston, K.L. Fowl cholera: cross immunity induced in
Rebers, P.A. turkeys with formalin-killed in-vivo-
propagated Pasteurella multocida
Avian Dis. 16, 578, 1972

- (51) Henning, J. Typisierung von *Pasteurella multocida* mit Hilfe des indirekten Hämagglutinations-testes
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 216, 414, 1971
- (52) Herrmann, J. Der heutige Stand unserer Erkenntnisse über die Kinetik der Keimabtötung durch Hitze
Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin, math.-naturwiss. R. 18, Nr. 6, 1007, 1969
- (53) Jayaraman, M.S.
Sethumadhavarn, V.
Kastri, C.S. The usefulness of agglutinations testes to detect immune and susceptible buffalo calves against *Pasteurella multocida* type I
Ind. Vet. J. 44, 271, 1967
Ldw. Zbl. 4-68/02-0208, 1968
- (54) Kagan, F.I.
Nikiforova, N.M.
Kolesova, A.I. Field trials of combined vaccine against black leg, malignant oedema and pasteurellosis in cattle
Trud. nauchno-kontrol. Inst. vet. Preparatov 13, 233, 1966
Vet. Bull. 37, 1150, 1967
- (55) Kordes, I.
Kordes, B.
Pichl, H.
Ganze, B.
Raettig, H. Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 217, 242 1971
- (56) Larson, K.A.
Schell, K.R. Toxicity and antigenicity of shipping fever vaccines in calves
J. Am. vet. med. Ass. 155, 495, 1969
- (57) Little, P.A.
Lyon, B.M. Demonstration of serological types within the nonhemolytic *Pasteurella*
Am. J. Vet. Res. 4, 110, 1943
- (58) Masjukov, A. V. (Die gelenkte Variabilität von pathogenen Mikroorganismen zur Gewinnung von Vakzinestämmen)
(Attenuierung von virulenten Pasteurellenstämmen)
Trud. Krasnodarskoj NIVS Nr. 3, 179, 1965
Ldw. Zbl. 4-68/04-0190, 1968

- (59) Matsuoka, T.
Gale, C.
Ose, E.E.
Berkman, R.N. Calfhood immunization against an experimental parainfluenza and pasteurella Challenge
Canad. J. Comp. Med. & Vet. Sci. 30, 228, 1966
- (60) Matsuoka, T.
Gale, C.
Ose, E.E.
Berkman, R.N. Immunity to experimental parainfluenza and pasteurella challenge following calfhood vaccination
Proc. 69th Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Ass. pp. 104 - 108, 1965
- (61) Matsuoka, T.
Folkerts, T.M.
Gale, C. Evaluation in calves of an inactivated bovine rhinotracheitis and parainfluenza-3 vaccine combined with pasteurella bacterin
J.A.V.M.A. 160, 333, 1972
- (62) Mayr, A.
Wizigmann, G.
Schels, H.
Plank, P. Entwicklung und Erprobung eines Kombinationsimpfstoffes gegen Parainfluenza-3, Mucosal Disease und Pasteurella haemolytica-Infektion des Rindes
Zbl. Vet. Med. 16 B, 454, 1969
- (63) Mukkur, T.K.S.
Nilakantan, P.R. Comparison of sodiumalginate and oil adjuvant in Pasteurella multocida vaccines
J. Bact. 96, 2180, 1968
Vet. Bull. 39, 2793, 1969
- (64) Mukkur, T.K.S.
Nilakantan, P.R. The relationship of hemagglutinating antibody with protection in cattle immunized against hemorrhagic septicemia
Cornell vet. 59, 643, 1969
- (65) Mukkur, T.K.S.
Nilakantan, P.R. Preliminary characterization of the crude extracts of Pasteurella multocida var. bovine type I in phase I
Cornell vet. 62, 289, 1972
- (66) Nagy, L.K.
Penn, C.W. Pasteurella multocida type B (Carter): the role of antibody against the type specific antigen in passive protection of mice
VII. Int. meeting on diseases of cattle London 1972
Kongreßbericht S. 689
- (67) Namioka, S.
Murata, M. Serological studies on Pasteurella multocida: I. A simplified method for capsule typing of the organism
Cornell vet. 51, 498, 1961

- (68) Namioka, S.
Murata, M. Serological studies on *Pasteurella multocida*
II. Characteristics of somatic (0) antigen of the organism
Cornell vet. 51, 501, 1961
- (69) Namioka, S.
Murata, M. Serological studies on *Pasteurella multocida*
III. O antigenic analysis of cultures isolated from various animals
Cornell vet. 51, 522, 1961
- (70) Namioka, S.
Bruner, D.W. Serological studies on *Pasteurella multocida*
IV. Type distribution of the organisms on the bases of their capsule and O groups
Cornell vet. 53, 41, 1963
- (71) Namioka, S.
Murata, M. Serological studies on *Pasteurella multocida*
V. Some epizootiological findings resulting from O antigenic analysis
Cornell vet. 54, 520, 1964
- (72) Namioka, S. Antigenic analysis of *Pasteurella multocida*
Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. 10, Suppl. 97, 1970
- (73) Nangia, S.S.
Baxi, K.K.
Seetharaman, C.
Gulrajani, T.S. Haemorrhagic septicaemia oil adjuvant vaccine-study of potency test in rabbits-duration of immunity and keeping quality
Indian vet. J. 43, 279, 1966
Vet. Bull. 36, 3778, 1966
- (74) Nikiforova, N.M.
Lukjanienko, A.V. (Öl-Adjuvans-Vakzine gegen Pasteurellose der Rinder, Büffel u. Schafe)
Trudy GNKI Nr. 8, 192, 1966
Ldw. Zbl. 4-68/03-0179, 1968
- (75) Nikiforova, N.M.
Lukjanienko, A.V. (Comparison of the immunogenicity of precipitated and emulsified vaccines against pasteurellosis in cattle, buffaloes and sheep)
Trudy GNKI Preparatov 14, 195, 1967
Vet. Bull. 38, 2975, 1968
- (76) Ose, E.E.
Muenster, B.S. A method for evaluation of vaccines containing *Pasteurella multocida*
Am. J. Vet. Res. 29, 1863, 1968

- (77) Palotay, I.L.
Young
Stuart
Lovelace, S.A.
Newhall, I.H. Bovine respiratory infections
II. Field trial using bacterial vaccine
products as a mean of prophylaxis
Am. J. Vet. Res. 24, 1137, 1963
- (78) Penn, C.W.
Nagy, L.K. The nature of the type-specific antigen
of *Pasteurella multocida*, types B and E
VII. Int. meeting on diseases of cattle
London 1972
Kongreßbericht S. 681
- (79) Precht, H.
Christophersen, J.
Hensel, H. Temperatur und Leben
Berlin 1955
- (80) Prince, G.H.
Smith, J.E. Antigenic studies on *Pasteurella multocida*
using immunodiffusion techniques
I. Identification and nomenclature of the
soluble antigens of a bovine haemorrhagic
septicaemia strain
II. Relationships with other Gramnegative
species
III. Relationships between strains of
Pasteurella multocida
J. comp. Path. 76, 303, 1966
- (81) Prince, G.H. Production of antigens of *Pasteurella*
multocida and detection of antibodies
against them in bovine sera
J. comp. Path. 79, 173, 1969
- (82) Rao, A.S.
Murthi, B.S. Antigenicity of Freund's type vaccines
against haemorrhagic septicaemia
Ind. Vet. J. 48, 1097, 1971
Vet. Bull. 42, 3244, 1972
- (83) Rao, A.S.
Sambamurti, B. Immunological studies on Freund's Type
vaccines against haemorrhagic septicaemia
in calves
Ind. Vet. J. 49, 25, 1972
Vet. Bull. 42, 4445, 1972
- (84) Roberts, R.S. An immunological study of *Pasteurella*
septica
J. comp. Path. & Ther. 57, 261, 1947

- (85) Rosner, S.F. Bovine parainfluenza type 3 virus infection and pasteurellosis
J.V.A.M.A. 159, 1375, 1971
- (86) Ryu, E. Studies on Pasteurella multocida
V. Further study on the immunizing value of egg agar vaccine against fowl cholera
Jap. J. vet. Sci. 23, 303, 1961
- (87) Sampson, G.R.
Gale, C.
Elliston, N.G.
Grueter, H.P.
McAskill, I.W.
Tonkinson, L.V. Bovine rhinotracheitis/parainfluenza-3-vaccine with pasteurella bacterin as the diluent
Vet. Med. and Small Anim. Clinician 67, 899, 1972
- (88) Sampson, G.R.
Matsuoka, T.
Olson, R.D.
Miyat, I.A.
Tonkinson, L.V. Clinical appraisal of an inactivated bovine rhinotracheitis/parainfluenza-3-vaccine with pasteurella bacterin
Vet. Med. and Small Anim. Clinician 67, 1356, 1972
- (89) Schipper, I.A.
Kelling, C.L. Shipping fever prophylaxis:
Comparison of vaccine and antibiotics administered following weaning
Can. vet. J. 12, 172, 1971
- (90) Schipper, E.
Nicolet, I.
König, H.
Steck, F. Virusbedingte Respirationskrankheiten in Kälber- und Rindermastbetrieben
Schweiz. Arch. Tierheilk. 114, 334, 1972
- (91) Shrivastava, S.C.
Rajagopalan V.R. Immunity in haemorrhagic septicaemia
I. Preparation of antigen by heatcold shock treatment
Ind. J. Anim. Hlth. 7, 43, 1968
Vet. Bull. 39, 1876, 1969
- (92) Shrivastava, S.C.
Rajagopalan, V.R. Immunity in haemorrhagic septicaemia
II. Comparative study on heat-killed and formalin-killed vaccines
Ind. J. Anim. Hlth. 10, 85, 1971
Vet. Bull. 42, 21, 1972

- (93) Sinha, S.K.
Tachibana, T.F.
Fagan, R. A quantitativ evaluation of immune response in mice following intraperitoneal inoculation of killed strains and an avirulent strain of *Pasteurella* (type II)
Cornell vet. 47, 281, 1957
- (94) Smith, J.E. Studies on *Pasteurella septica*
II. Some cultural and biochemical properties of strains from different host species
J. comp. Path. 68, 315, 1958
- (95) Srivastava, K.K.
Foster, I.W.
Dawe, D.L.
Brown, I.
Davis, R.B. Immunization of mice with components of *Pasteurella multocida*
Appl. Microbiol. 20, 951, 1970
- (96) Staudacher, H. Das Auftreten agglutinierender Antikörper gegen Pasteurellen bei Kälbern und Rindern in Südbayern
Vet. med. Dissertation München 1968
- (97) Steck, F.
Nicolet, I.
Schipper, E. Ätiologische Untersuchungen über virale und bakterielle Infektionen in Kälber- und Rindermastbetrieben
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 84, 21 1971
- (98) Stone, D.
Davidson, A.V. Five viruses associated with calf pneumoniacomplex
VII. Int. meeting on diseases of cattle London 1972
Kongreßbericht
- (99) Stryszak, A. Contribution to the epizootiology of pasteurellosis
Arch.exper.Vet. med. 24, 179, 1970
- (100) Sutton, M.L. Comments on immunization procedures for pasteurellosis
J.A.V.M.A. 152, 886, 1968
- (101) Tacu, D.
Cernea, I.
Butura, I.
Paduraru, V.
Romanovski, S. (Comparison between an alum-precipitated vaccine and a formolized vaccine against bovine pasteurellosis)
Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur 2, 87, 1965
Vet. Bull. 37, 24, 1967

- (102) Tacu, D.
Cernea, I.
Butura, I.
Paduraru, V.
Romanovski, S.
(Protective potency of serum from cattle vaccinated with *Pasteurella multocida* killed cultures, with or without the addition of alum)
Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur 3, No. 1, 175, 1966
Vet. Bull. 37, 1942, 1967
- (103) Tacu, D.
Cernea, I.
Butura, I.
Paduraru, V.
Romanovski, S.
(Untersuchungen über die von der Saponin-vakzine gegen Rinderpasteurellose verliehene Immunität)
Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur 4, Nr. 3, 175, 1967
Ldw. Zbl. 4-68/09-0220, 1968
- (104) Tacu, D.
(Untersuchungen über die Herstellung eines öligen Impfstoffes gegen die Rinderpasteurellose)
Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur 6, 481, 1969
Ldw. Zbl. 4-70/09-0212, 1970
- (105) Tacu, D.
Cernea, I.
Butura, I.
Paduraru, V.
(Protective value of serum from cattle immunized with a pasteurellosis vaccine with saponin added)
Lucr. Inst. Cerc. Vet. Bioprep. Pasteur 7, Part. I, 181, 1971
Vet. Bull. 42, 1720, 1972
- (106) Thomas, J.
Studies on haemorrhagic septicaemia oil-adjuvant vaccine
I. Method of production of vaccine
Kajian Vet. 1, 152, 1968
Vet. Bull. 39, 4084, 1969
- (107) Thomas, J.
Omar, A.R.
Fazdil, M.
Mustaffa-Babjee, A.
Vendargon, X.A.
Studies on haemorrhagic septicaemia oil-adjuvant vaccine
II. Field and laboratory trials
Kajian Vet. 2, 4, 1969
Vet. Bull. 40, 443, 1970
- (108) Thomas, J.
Studies on haemorrhagic septicaemia oil-adjuvant vaccine
III. Serological studies
Kajian Vet. 2, 103, 1970
Vet. Bull. 42, 1718, 1972

- (109) Thomas, J. The controll of haemorrhagic septicaemia
in West Malaysia
Tropic. Anim. Hlth. Prod. 4, 95, 1972
- (110) Thomson, R.G. Pneumonic pasteurellosis of cattle:
Benson, M.L. microbiology and immunology
Savan, M. Can. J. comp. Med. 33, 194, 1969
- (111) Woods, G.T. The role of viral agents in respiratory
Segre, D. diseases of cattle
Barthel, C. II. A respiratory disease in feeder cattle
Brandly, C.A. vaccinated with pasteurella bacterin and
Holper, J.C. bovine parainfluenza-3 vaccine before
shipment
Am.J.Vet.Res.23, 987, 1962

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. Mayr möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für wertvolle Hinweise danken.

Ferner danke ich Herrn Dr. G. Baljer für die hilfreiche Unterstützung.

Lebenslauf

Am 28. März 1945 wurde ich, Stefan Chorherr, als Sohn des Georg Chorherr und seiner Ehefrau Maximiliane, geb. Schmid, in Weilheim geboren.

Nach 5 Volksschulklassen in Weßling trat ich 1956 in das Karlsgymnasium in München-Pasing ein und legte dort 1965 die Reifeprüfung ab.

Das Studium der Tiermedizin begann ich im Sommersemester 1967 an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Die Tierärztliche Prüfung legte ich 1972 ab.

